

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

A04

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ :

G01N 15/04, 15/05

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/46585

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum:

10. August 2000 (10.08.00)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00831

(22) Internationales Anmeldedatum: 2. Februar 2000 (02.02.00)

(30) Prioritätsdaten:

199 04 267.5

3. Februar 1999 (03.02.99)

DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE];
Gleimstrasse 2, D-81677 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert, C.
[DE/DE]; Dohlenweg 6, D-85757 Karlsfeld (DE).
BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Thanner Strasse 35a,
D-83607 Holzkirchen (DE).

(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzregenten-
strasse 16, D-80538 München (DE).

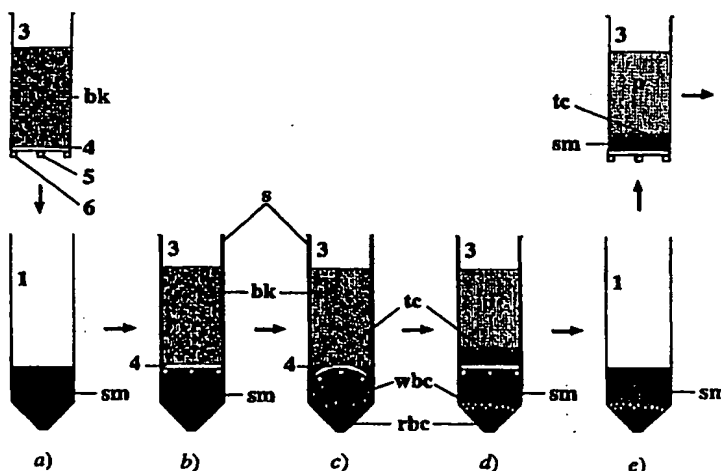
(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, EE, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD,
SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS,
MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD FOR ENRICHING OR DEPLETING TUMOUR CELLS OBTAINED FROM A BODY FLUID AND KIT
SUITABLE FOR THIS PURPOSE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AN- ODER ABREICHERUNG VON TUMORZELLEN AUS EINER KÖRPERFLÜSSIGKEIT
UND DAZU GEEIGNETER KIT



(57) Abstract

The invention relates to a method for enriching or depleting tumour cells obtained from a body fluid, according to which a cell separation medium having a specific density is covered with the body fluid and centrifuged. The invention also relates to a kit suitable for said method.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, worin ein Zellseparationsmedium spezifischer Dichte mit der Körperflüssigkeit überschichtet und zentrifugiert wird. Ein für dieses Verfahren geeigneter Kit wird ebenfalls bereitgestellt.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit und dazu geeigneter Kit

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit sowie einen dazu geeigneten Kit.

Nahezu alle soliden malignen Tumore haben das Potential zur Metastasenbildung. Der Prozeß der Metastasierung beinhaltet die Aussaat maligner Zellen als Mikrometastasen, zumeist auf dem Blut- bzw. Lymphweg in entfernte Organe und die Ausbildung autonomer Tochtergeschwülste. Das Ausmaß der Filiarisierung bestimmt die Prognose eines Tumorleidens.

Die Ansprüche von Tumurvorsorge- oder Nachsorgeprogrammen liegen in der Früherkennung von Primärtumoren bzw. Rezidiven oder von Metastasen noch bevor diese klinisch manifest werden. Dieses Ziel kann bislang mit den verfügbaren apparativen Techniken nicht zufriedenstellend erfüllt werden. Durch den Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen z.B. im peripheren Blut könnte frühzeitig, d.h. noch vor dem Auftreten eines klinisch bemerkten Tumors, eine möglicherweise kurative Immunmodulations- oder Polychemotherapie eingeleitet werden. Die Quantifizierung der Tumorzellen im peripheren Blut vor und nach der Therapie stellt dabei eine wichtige Kontrolle dar.

Da Körperflüssigkeiten im allgemeinen eine Vielzahl unterschiedlichster Zellen enthalten, ist es wünschenswert vor

einer Quantifizierung bestimmter Zelltypen wie Tumorzellen, diese anzureichern und gleichzeitig eine möglichst große Menge von unerwünschten Zellen abzureichern, um die Quantifizierung zu erleichtern.

Darüber hinaus besteht ein erfolgversprechender Ansatz zur Quantifizierung von Tumorzellen in der Bestimmung der Telomerase-Aktivität einer Körperflüssigkeit. Beispielsweise beschreiben Kim et al. in Science (1994) 266: 2011 einen Assay, mit dem Telomerase-Aktivitäten in Tumorgeweben bestimmt werden können.

Im peripheren Blut weisen jedoch neben Tumorzellen auch hämatopoetische Stammzellen und aktivierte Lymphozyten eine erhöhte Telomerase-Aktivität auf. Aufgrund dieser Tatsache muß vor dem Nachweis einer Telomerase-Aktivität als Marker für disseminierte zirkulierende Tumorzellen im Blut eine Trennung der Telomerase-aktiven hämatopoetischen Stammzellen und Lymphozyten von den Tumorzellen vorgenommen werden.

Neben der Quantifizierung von Tumorzellen in Körperflüssigkeiten kann aber beispielsweise auch deren histologische Untersuchung unter einem Mikroskop von Interesse sein. Darüber hinaus können unter sterilen Bedingungen isolierte Tumorzellen in Kultur genommen werden, um daraus entsprechende Zelllinien zu etablieren. Zelllinien die von disseminierten zirkulierenden Tumorzellen abstammen anstatt von soliden Tumoren bieten die Möglichkeit, Prozesse der Metastasierung differenzierter untersuchen zu können. Darüber hinaus könnten diese Zelllinien beispielsweise zur Entwicklung von effektiveren Tumorthérapeutika beitragen.

Zur Anreicherung von Tumorzellen können beispielsweise mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen Epithelzell-spezifische Antigene, wie z.B. EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), HEA (Human Epithelial Antigen) und Cytokeratin 7/8, epitheliale Tumorzellen markiert werden und an magnetische Partikel oder fluoreszierende Moleküle gekoppelt, dann zur

Anreicherung mittels eines Zell-Separators, wie MACS (Magnetic Cell Sorting) oder FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), verwendet werden. Diese Verfahren haben jedoch den Nachteil, daß nur Tumorzellen epithelialen Ursprungs erfaßt werden, nicht jedoch beispielsweise Melanomzellen. Außerdem sind diese Verfahren aufwendig und teuer.

In den 60er- und 70er-Jahren, als Methoden wie beispielsweise FACS oder MACS noch nicht zur Verfügung standen, wurden Tumorzellen von hämatopoetischen Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte getrennt (J.A. Fleming et al., J. clin. Path. (1967), 20, 145). Entsprechend dieser Daten besitzen Tumorzellen eine spezifische Dichte von 1,040-1,080, während Erythrozyten und polymorphnukleäre Leukozyten eine höhere Dichte aufweisen. Lymphozyten weisen hingegen eine spezifische Dichte im Bereich von 1,060-1,075 auf und überschneiden sich somit mit der spezifischen Dichte von Tumorzellen. Eine vollständige Abtrennung der ebenfalls Telomerase-aktiven Lymphozyten von den Tumorzellen über deren Dichteunterschiede sollte somit nicht möglich sein. So zeigte auch die Verwendung einer Standardlösung zur Isolierung von Lymphozyten, wie z.B. Histoprep® (Sigma) mit einer Dichte von 1,077 g/ml, daß Lymphozyten von gesunden Blutspendern mit einer Dichte von bis zu 1,077 g/ml eine Telomerase-Aktivität aufweisen.

Trotz umfangreicher Forschungen ist es bislang nicht gelungen, ein einfaches, schnelles und kostengünstiges Standardverfahren zur Tumorzellanreicherung aus Körperflüssigkeiten zu entwickeln, bei dem auch Telomerase-aktive nicht-Tumorzellen abgetrennt werden.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht somit darin, ein Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit zur Verfügung zu stellen, das die obengenannten Nachteile nicht aufweist und insbesondere auch in der Lage ist, nicht-Tumorzellen, die eine Telomerase-Aktivität aufweisen, von den gewünschten Tumorzellen abzutrennen.

Es wurde nun überraschend gefunden, daß diese Aufgabe dadurch gelöst werden kann, daß man ein Zellseparationsmedium mit einer Dichte im Bereich von 1,055 bis 1,065 g/ml mit der Körperflüssigkeit, die Tumorzellen enthält, überschichtet und zentrifugiert. Durch die Verwendung des speziellen Zellseparationsmediums werden die in der Körperflüssigkeit vorhandenen Zellen so aufgetrennt, daß die aufgrund ihrer Dichte zusammen mit den Tumorzellen angereicherten Lymphozyten keine Telomerase-Aktivität aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, worin ein Zellseparationsmedium mit der Körperflüssigkeit überschichtet und zentrifugiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,055 bis 1,065 g/ml aufweist.

Es versteht sich, daß das erfindungsgemäße Verfahren in Abhängigkeit davon, mit welcher Fraktion nach der Zentrifugation weitergearbeitet wird, sowohl zur An- als auch zur Abreicherung von Tumorzellen eingesetzt werden kann. Im folgenden wird daher nicht zwischen diesen beiden möglichen Weiterbehandlungen unterschieden sondern allgemein von Anreicherung gesprochen, wobei erfindungsgemäß jedoch stets beide Möglichkeiten umfaßt sind.

Das Anreicherungsverfahren verwendet ein Zellseparationsmedium als diskontinuierlichen Gradienten, das mit der Körperflüssigkeit überschichtet wird. Durch Zentrifugation werden die Zellen ihrer spezifischen Zelldichte nach aufgetrennt und können in einzelnen Fraktionen abgenommen werden. Der spezifische Dichtegrad des Zellseparationsmediums erlaubt eine fast vollkommene Trennung von Tumorzellen von den in den Körperflüssigkeiten befindlichen korpuskulären Anteilen, speziell den Zellen des roten und weißen Blutsystems. Darüber hinaus erlaubt es das Verfahren, Telomerase-positive von Telomerase-negativen hämatopoetischen Zellen zu trennen, wobei

sich die angereicherten Tumorzellen nach der Zentrifugation in der gleichen Fraktion befinden wie die Telomerase-negativen hämatopoetischen Zellen, so daß eine anschließend nachgewiesene Telomerase-Expression in dieser Fraktion zweifelsfrei auf vorhandene Tumorzellen zurückgeführt werden kann.

Überraschend ist auch, daß durch die gegenüber dem Stand der Technik nur geringfügige Verringerung der Dichte des Zellseparationsmediums eine erhebliche Reduzierung der kontaminierenden Blutzellen erreicht wird. Dadurch wird die Gesamt-Zellzahl signifikant verringert, ohne daß signifikante Verluste an Tumorzellen auftreten, wodurch z.B. das Screening von mikroskopischen Präparaten erheblich vereinfacht und im klinischen Maßstab erst möglich wird.

Es wurde gefunden, daß eine besonders gute Trennleistung, im Sinne einer Anreicherung von Tumorzellen und einer gleichzeitigen Abreicherung von unerwünschten Blutzellen mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte im Bereich von 1,055-1,065 g/ml, bevorzugt von 1,059-1,062 g/ml und besonders bevorzugt von etwa 1,060 g/ml, insbesondere 1,060 g/ml \pm 0,0005 g/ml erzielt wird.

Es wurde auch gefunden, daß die Trennleistung des Zellseparationsmediums auch von dem Alter des Blutes nach Blutentnahme, und von der Konzentration der dem Blut beigesetzten Antikoagulanzen abhängig ist. Es wurde auch gefunden, daß bei Frischblut, d.h. Blut, das noch am gleichen Tag (= 24 Stunden) der Blutabnahme untersucht wird, eine besonders gute Trennleistung mit einem Zellseparationsmedium im besonders bevorzugten Bereich von etwa 1,060 g/ml \pm 0,0005 g/ml erzielt wird.

Die Zentrifugation wird vorteilhaft bei ca. 500 bis 2.000 x g, bevorzugt bei ca. 1.000 x g über ca. 10 bis 30 Minuten, bevorzugt über 20-30 Minuten durchgeführt. Die Temperatur während der Zentrifugation beträgt vorzugsweise ca. 4°C. Dies

bewirkt, daß die katalytische Aktivität von Proteasen, DNAsen bzw. RNAsen möglichst gering gehalten wird.

Als Zellseparationsmedium läßt sich im Prinzip jede geeignete Flüssigkeit gewünschter Dichte verwenden. Das Zellseparationsmedium sollte nicht mit der Körperflüssigkeit oder den darin enthaltenen Zellen reagieren. Vorteilhaft kann beispielsweise Ficoll oder Percoll bzw. ein percoll- oder ficollähnliches Medium verwendet werden, wobei die Lösungen jeweils nach Anweisungen des Herstellers auf die gewünschte Dichte gebracht werden. Beispielsweise berechnet sich die Menge der zu verdünnenden Percoll-Stammlösung mit einer Dichte von 1,13 g/ml, die zur Herstellung von 100 ml einer Percoll-Arbeitslösung gewünschter Dichte (dd) benötigt wird, nach der Formel:

$$100 \text{ ml} \times (dd - 0,106 - 0,9)/0,13.$$

10% der Percoll-Arbeitslösung gewünschter Dichte bestehen immer aus einer 10 x physiologischen Lösung, wie z.B. 10 x PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung), oder aus einer 1,5 M NaCl-Lösung, um eine physiologische Osmolarität zu gewährleisten. Die Differenz zwischen der nach der vorstehenden Formel berechneten Menge an Percoll-Stammlösung (Dichte 1,13 g/ml) und der Salzlösung zu 100 ml wird dann mit Wasser aufgefüllt.

Damit läßt sich eine Percoll-Arbeitslösung mit einer Dichte von 1,060 g/ml beispielsweise wie folgt herstellen:

41,54 ml	der Percoll-Stammlösung (Dichte von 1,13 g/ml)
48,46 ml	H ₂ O
<u>10,00 ml</u>	<u>1,5 M NaCl</u>

100,00 ml Percoll-Arbeitslösung, dd 1,060 g/ml

Vorteilhaft wird die Dichte des Zellseparationsmediums mit Hilfe eines Dichtemeßgerätes (DMA 4500, Anton Paar, Österreich) bei der entsprechenden Arbeitstemperatur von 4°C eingestellt.

Bei der anschließenden Zellseparation sollte darauf geachtet werden, daß eine Umgebungs- bzw. Arbeitstemperatur von 8°C nicht überschritten wird. Dies würde zu einer signifikanten Erniedrigung der Percoll-Dichte (vgl. Figur 1) und zu unerwünschtem Zellverlust führen.

Bei der Körperflüssigkeit, aus der Tumorzellen angereichert werden sollen, kann es sich um jede menschliche oder tierische Körperflüssigkeit oder um eine Dispersion von Zellgewebe handeln. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Blut, insbesondere peripheres Blut wie venöses oder arterielles Blut, Lymphe, Urin, Exsudate, Transudate, Spinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Speichel, Flüssigkeiten aus natürlichen oder unnatürlichen Körperhöhlen, Knochenmark und dispergiertes Körpergewebe. Bei den Flüssigkeiten aus natürlichen Körperhöhlen kann es sich beispielsweise um seröse Flüssigkeiten wie Peritoneal- und Pleuraflüssigkeiten handeln, bei den Flüssigkeiten aus unnatürlichen Körperhöhlen kann es sich beispielsweise um Flüssigkeiten aus Zysten handeln.

Bevorzugte Körperflüssigkeiten sind Blut, Knochenmark, Lymphe, seröse Flüssigkeiten aus Körperhöhlen sowie Urin, wobei Blut und Urin besonders bevorzugt sind. Urin eignet sich insbesondere zur Anreicherung von Zellen von Blasentumoren.

Die bevorzugteste Körperflüssigkeit ist jedoch peripheres Blut, das vorteilhaft in einer gerinnungshemmenden Substanz abgenommen und vor dem Überschichten des Zellseparationsmediums mit einem Verdünnungsmittel verdünnt wird. Als gerinnungshemmende Substanzen können beispielsweise EDTA oder Citrat bzw. Heparin oder CPD (Citrat, Phosphat, Dextrose) oder vergleichbare Substanzen eingesetzt werden. Als peripheres Blut eignet sich venöses oder arterielles Blut.

Die zu untersuchende Körperflüssigkeit wird entsprechend gängiger Standardprotokolle entnommen bzw. gesammelt. In Abhängigkeit von der Art der Körperflüssigkeit wird diese dann entweder zunächst mit einem Verdünnungsmittel, bevorzugt einem

Puffer, verdünnt oder direkt unverdünnt in einem Zentrifugationsgefäß über das Zellseparationsmedium geschichtet. Alternativ kann die Körperflüssigkeit zuvor bei beispielsweise 1.000 x g für ca. 10 Minuten zentrifugiert und nach Resuspension der Zellen in einem Puffer über das Zellseparationsmedium geschichtet werden. Der bevorzugt verwendete Puffer ist Dulbecco PBS. Als Zentrifugationsgefäß eignet sich insbesondere ein Zentrifugationsgefäß, das aus Kunststoff, wie z.B. Polypropylen hergestellt ist, um einer unspezifischen Adsorption von Zellen vorzubeugen. Das Zentrifugationsgefäß sollte verschließbar sein.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden der Körperflüssigkeit vor dem Überschichten eine oder mehrere Substanzen zugegeben, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern. Diese Substanzen können zum Beispiel mit dem als Verdünnungsmittel verwendeten Puffer zugesetzt werden. Als Substanzen, die eine unerwünschte Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern, eignen sich beispielsweise EDTA, Citrat und ACD-A (acid citrate dextrose). Zusätzlich oder statt dessen kann die Körperflüssigkeit vor dem Überschichten von Substanzen befreit werden, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen fördern. Hierbei handelt es sich beispielsweise um Ionen wie Magnesium- und Calciumionen.

Im Zentrifugationsgefäß wird das Zellseparationsmedium, das eine höhere Dichte als die zu untersuchende Körperflüssigkeit aufweist, vorgelegt, und anschließend mit der Körperflüssigkeit überschichtet. Je nach Größe des Zentrifugationsgefäßes und dem Volumen der Körperflüssigkeit, aus der die Tumorzellen angereichert werden sollen, kann das Zellseparationsmedium beispielsweise mit einem Volumen von 1-500 ml vorgelegt werden.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes nach der Zentrifugation und vor der Abnahme der an Tumorzellen angereicherten Interphase kurzzeitig stark abgekühlt wird um Zell-Kontaminationen zu

verhindern. Beispielsweise können die im Zellpellet befindlichen Erythrozyten und Leukozyten dadurch immobilisiert werden, daß das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes für 5-10 Minuten in flüssigem Stickstoff stark abgekühlt wird. Als Interphase wird vorliegend der Übergang zwischen dem Zellseparationsmedium und der darüberliegenden Körperflüssigkeit bezeichnet. In dieser Interphase reichern sich die Tumorzellen an und werden nach der Zentrifugation beispielsweise durch Absaugen dieser Phase gesammelt. Durch das starke Abkühlen des Zentrifugationsgefäßes wird ein Vermischen der Zellen aus den verschiedenen Phasen verhindert, wodurch falsch-positive Testergebnisse ausgeschlossen werden können.

Um einen möglichst einfachen Ablauf der Arbeiten zu sichern, kann in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die Zentrifugation in einem Gefäß durchgeführt werden, das durch eine Barriere, einen Filter oder ein Sieb, nachfolgend poröse Barriere oder Barriere genannt, in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt ist, wobei das Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment vorgelegt und die Körperflüssigkeit in das obere Kompartiment eingebracht wird. Hierdurch wird ein Vermischen der zu untersuchenden Körperflüssigkeit im oberen Kompartiment mit dem Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment vor und nach dem Zentrifugationsschritt vermieden.

Die Position der porösen Barriere in dem Zentrifugationsgefäß kann dabei so gewählt werden, daß der Flüssigkeitsspiegel des Zellseparationsmediums entweder genau unterhalb, genau innerhalb oder genau oberhalb der porösen Barriere zu liegen kommt.

Die poröse Barriere kann beispielsweise eine Dicke von 0,5-10 mm, vorzugsweise von 1-5 mm aufweisen. Die poröse Barriere sollte darüber hinaus eine Festigkeit aufweisen, die es ihr erlaubt den Zentrifugationskräften unbeschadet Stand zu halten.

Eine bevorzugte Verwendung finden Barrieren mit einer porösen Beschaffenheit, die es erlaubt, daß bei der Zentrifugation Flüssigkeiten sowie die korpuskulären Bestandteile des Blutes, wie die Zellen des roten und weißen Blutsystems, welche eine höhere Dichte als das vorgelegte Zellseparationsmedium haben, die poröse Barriere ungehindert passieren können. Dies hat zur Folge, daß das Zellseparationsmedium während der Zentrifugation durch die poröse Membran in das obere Kompartiment gedrängt wird und die Tumorzellen und Thrombozyten welche eine geringere Dichte als das vorgelegte Zellseparationsmedium haben, auf einer Ebene oberhalb der Barriere zu liegen kommen. Hierzu eignen sich insbesondere poröse Barrieren mit einer Porengröße von 20-100 µm, vorzugsweise 20-30 µm.

Die poröse Barriere kann aus jedem geeigneten Material bestehen. Beispielsweise eignen sich Kunststoff, Metall, Keramik oder eine Mischung oder spezielle Legierung dieser Stoffe. Es kann aber auch jedes andere natürliche oder künstliche, geeignete Material eingesetzt werden.

In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die poröse Barriere aus einem hydrophoben Material oder ist mit einem hydrophoben Material beschichtet.

In einem Zentrifugationsgefäß kann alternativ zur Barriere auch eine Klappe eingesetzt werden, die das Zentrifugationsgefäß analog zur Barriere in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt.

Diese Klappe hat eine Beschaffenheit die es erlaubt, daß sie vor und nach der Zentrifugation dicht verschlossen ist und nur während der Zentrifugation durch die Zentrifugationskraft geöffnet wird. Während der Zentrifugation treffen, bei geöffneter Klappe, die Flüssigkeiten des unteren und des oberen Kompartiments zusammen. Dies hat zur Folge, daß die Zellen des roten und weißen Blutsystems, welche eine höhere Dichte als das vorgelegte Zellseparationsmedium haben, in das untere

Kompartiment gelangen und das Zellseparationsmedium in das obere Kompartiment drängen. Dies hat den Effekt, daß die Tumorzellen, welche eine geringere Dichte als das vorgelegte Zellseparationsmedium haben, auf einer Ebene oberhalb der Klappe zu liegen kommen.

Bevorzugt kann als Klappe ein Material verwendet werden, das eine höhere Dichte als das verwendete Zellseparationsmedium aufweist und zugleich so flexibel ist, daß sich die Klappe während der Zentrifugation in das im unteren Kompartiment vorgelegte Zellseparationsmedium öffnen und sich nach der Zentrifugation wieder vollständig und dicht schließen kann. Beispielsweise eignen sich Kunststoff, Metall oder eine Mischung oder spezielle Legierung dieser Stoffe. Es kann aber auch jedes andere natürliche oder künstliche, geeignete Material eingesetzt werden.

Die Klappe kann beispielsweise eine Dicke von 0,5-10 mm, vorzugsweise ca. 1-5 mm aufweisen. Die Klappe sollte darüber hinaus eine Festigkeit aufweisen, die es ihr erlaubt, den Zentrifugationskräften unbeschadet Stand zu halten.

In einer ebenfalls bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die Klappe aus einem hydrophoben Material oder ist mit einem hydrophoben Material beschichtet.

In einer bevorzugten Verwendung der Klappe, kann die Klappe in unterschiedlicher Weise angebracht sein: a) analog zur Barriere starr mit dem Zentrifugationsgefäß verbunden, b) starr mit dem Zentrifugationsgefäß verbunden, wobei das Zentrifugationsgefäß selbst in 2 Teile, in einen unteren und in einen oberen Teil, zerlegbar ist und die Klappe den Boden des oberen Teiles bildet (Figur 3), oder c) starr mit einem Einsatz verbunden, der in das Zentrifugationsgefäß eingeführt werden kann, wobei die Klappe den Boden des Einsatzes bildet (Figur 2).

Die Verwendung einer Klappe in einem teilbaren Zentrifugationsgefäß bzw. in einem Einsatz, erlaubt einen höheren

Automatisierungsgrad sowie eine verbesserte sterile Handhabung und bietet gegenüber der Barriere den Vorteil, daß nach der Zentrifugation die im oberen Kompartiment befindlichen Zellen direkt in ein weiteres Gefäß zentrifugiert werden können, 1) indem der obere Teil des Zentrifugationsgefäßes auf einen neuen unteren Teil bzw. 2) der Einsatz in ein neues Zentrifugationsgefäß gesetzt wird.

Es hat sich für das erfindungsgemäße Verfahren als vorteilhaft erwiesen, Klappen zu verwenden, die sich während der Zentrifugation, nicht aus ihrem Zentrum heraus, sondern von ihren äußeren Rändern aus in das untere Kompartiment öffnen. Dies liegt darin begründet, daß sich bei sich zentral öffnenden Klappen, ein unerwünscht hoher Prozentsatz an Zellen an den Rändern zurückgehalten wird. Dies hat zur Folge, daß diese Zellen nicht gemäß ihrer Dichte entsprechend vollständig aufgetrennt werden können und somit die angereicherten Tumorzellen im oberen Kompartiment des Zentrifugationsgefäß kontaminieren.

Für das erfindungsgemäße Verfahren werden somit Klappen bevorzugt, die sich von ihren äußeren Rändern aus in das untere Kompartiment öffnen. Es hat sich erwiesen, daß diese Form von Klappen eine vollständige Trennung von Zellen gemäß ihrer Dichte zulassen. In Figur 3 wird beispielhaft eine entsprechende Flügelklappe gezeigt.

Mit Hilfe der porösen Barriere oder Klappe kann die zu untersuchende Körperflüssigkeit in das Zentrifugationsgefäß gefüllt werden, ohne daß sie sich mit dem darunterliegenden Zellseparationsmedium vermischt und somit die Anreicherung beeinträchtigen oder unmöglich machen kann.

Nach der Zentrifugation befinden sich die in der Körperflüssigkeit vorhandenen Tumorzellen in der Interphase des oberen Kompartiments des Zentrifugationsgefäßes. Die Flüssigkeit oberhalb der Interphase kann dann zu etwa 80% vorsichtig abgesaugt und verworfen werden. Bei dieser

Restflüssigkeit handelt es sich beispielsweise bei der Verwendung von Blut als Körperflüssigkeit um Plasma, ein Plasma/PBS-, bzw. Plasma/Puffer-Gemisch, das die Proteine des Plasmas enthält.

Der verbleibende Überstand oberhalb der Barriere oder Klappe, in dem sich die Tumorzellen befinden, kann anschließend gesammelt und beispielsweise in ein frisches Zentrifugationsgefäß (vorzugsweise aus gegebenenfalls silikonisiertem Kunststoff und mit der gleichen Volumenkapazität wie das zuvor verwendete Zentrifugationsgefäß) überführt werden. Die poröse Barriere bzw. die geschlossene Klappe verhindert bei der Entnahme des verbleibenden Überstands ein Vermischen der Zellen des oberen und des unteren Kompartiments.

Vorteilhaft wird anschließend das obere Kompartiment des Zentrifugationsgefäßes beispielsweise zweimal mit einem Puffer nachgewaschen und dieser wird ebenfalls in das frische Zentrifugationsgefäß überführt. Als Puffer eignen sich beispielsweise Dulbeccos PBS (3,9 mM EDTA, pH 8,0 ohne Calcium und Magnesium) oder NaCl/10% ACD-A (Guidelines for the collection, processing and storage of human bone marrow and peripheral stem cells for transplantation, prepared by the BCSH Blood Transfusion Task. Transfus. Med. 1994; 4: 165-72) oder NaCl/5% ACD-A/1% Albumin). Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, dem Puffer Proteine, wie z.B. 0,1% bis 10% BSA (Bovines Serum Albumin) zuzusetzen, da unspezifische Bindungen der zu sammelnden Zellen an Oberflächen wie Gefäßwand, Barriere bzw. Klappe, Pipettenspitzen etc. verhindert werden. Nach einer weiteren Zentrifugation beispielsweise bei 1.000 x g über ca. 10 Minuten bei einer Temperatur von ca. 4°C können die gesammelten Zellen beispielsweise den Tumorzellnachweismethoden zugeführt werden.

Nachdem in der gesammelten Tumorzellfraktion auch Thrombozyten angereichert werden, kann es vorteilhaft sein, die Thrombozyten noch zweimal in einem Puffer (z.B. PBS mit 0,1% - 10% BSA) zu

waschen und bei ca. 200 x g und 10 Minuten zu zentrifugieren, wenn die gesammelten Zellen z. B. auf Objektträger aufgebracht werden sollen.

Um den nach der Zentrifugation die Tumorzellen enthaltenden Zellring an der Interphase zwischen Zellseparationsmedium und Körperflüssigkeit für die Entnahme aus dem Zentrifugationsgefäß besser sichtbar zu machen, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, dem Zellseparationsmedium einen Farbstoff zuzugeben. Beispielsweise können zu 100 ml einer Percoll-Arbeitslösung 100 µl einer 1% Trypan-Blau-Lösung zugegeben werden.

Bei Verwendung eines Zentrifugationsgefäßes mit poröser Barriere bzw. Klappe wird nach Entnahme der überstehenden Restflüssigkeit oberhalb der Interphase jedoch bevorzugt nicht nur die Interphase sondern die gesamte verbliebene Flüssigkeit oberhalb der porösen Barriere entnommen, nicht weil sich zwischen Interphase und poröser Barriere bzw. Klappe noch weitere Zellen befinden, sondern weil durch die Abnahme die im Zellring enthaltenen Zellen leicht durchmischt werden können. Um keine Zellen aus dem oberen Kompartiment zu verlieren wird dieses vorteilhaft noch zweimal mit einem Puffer (z.B. PBS mit 0,1% - 10% BSA) gewaschen.

Alternativ können bei der Verwendung eines Einsatzes oder eines teilbaren Zentrifugationsgefäßes, die oberhalb der Klappe befindlichen Zellen direkt in ein neues Zentrifugationsgefäß zentrifugiert werden. Dies geschieht dadurch, daß der Einsatz in ein neues Zentrifugationsgefäß eingeführt (Figur 4), bzw. der obere Teil des Zentrifugationsgefäßes auf einen neuen unteren Teil gesteckt wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können zirkulierende Tumorzellen und insbesondere zirkulierende Tumorzellen von soliden Tumoren, d.h. von nicht-hämatologischen Tumoren, angereichert werden oder hämatologische Tumorzellen, d.h. Tumorzellen des roten und weißen Blutsystems.

Mit dem erfindungsgemäßen Tumorzellanreicherungsverfahren können Tumorzellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte nahezu vollständig von den korpuskulären Bestandteilen von Körperflüssigkeiten wie z.B. den Zellen des roten und weißen Blutsystems getrennt, konzentriert und beispielsweise einer der bekannten Tumorzellennachweisverfahren zugeführt werden.

Die Methoden zum Nachweis von Tumorzellen umfassen das gesamte Spektrum der gängigen Diagnostik. Beispiele hierfür sind die mikroskopischen, immunzytologischen/immunzytochemischen, biochemischen und/oder molekularbiologischen Verfahren. Beispielsweise können die Tumorzellen nach der Anreicherung als ganze Zellen oder als Zellenbestandteile direkt oder nach Zellkultur und Expansion der Tumorzellen durch morphologische, immunzytologische/immunzytochemische, biochemische und/oder molekularbiologische Verfahren nachgewiesen werden. Diese Verfahren ermöglichen den Nachweis einer ganzen Zelle, der spezifischen Aktivität einer Zelle oder den Nachweis von spezifischen Bestandteilen einer ganzen Zelle. Beispiele von Bestandteilen einer ganzen Zelle sind u.a. Proteine und Glykoproteine der Membran, des Zytoplasmas oder des Zellkerns, sowie die Chromosomen, spezifische Abschnitte von Chromosomen bis hin zu Nukleinsäuresequenzen, wie DNA, RNA und cDNA.

Beispiele direkter Zellenachweisverfahren sind u.a. sämtliche Formen der Mikroskopie einschließlich der Färbung von Zellen oder Zellbestandteilen. Beispiele direkter Färbung sind die Trypan-Blau-Färbung oder die Färbung durch spezifische Antikörper, die gegen spezifische Bestandteile der Zelle, wie der Zellmembran, das Zytoplasma oder der Zellkern gerichtet sind und an denen Markierungssignale wie z.B. fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Nachweisverfahren sind u.a. Durchflußzytometrie oder FACS (Fluorescence activated cell sorting), ELISA und Western Blotting. Weitere Verfahren zum Nachweis von Zellbestandteilen sind u.a. die Detektionsverfahren von Nukleinsäuren mit Hilfe von markierten Sonden, z. B. FISH, in situ Hybridisierung, Northern, South-Western und Southern Blotting oder differential display sowie

u.a. die Amplifikationsverfahren von Nukleinsäuren u.a. die PCR, RT-PCR, in situ RT-PCR und NASBA.

Weiterhin ist es vorteilhaft, Verfahren einzusetzen, die eine spezifische Bindung eines Antikörpers an ein Protein oder eines Oligonukleotids an eine Nukleinsäure (DNA, RNA oder cDNA) durch eine Signalamplifizierung sichtbar machen. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz spezifischer Dendrimere (Polyprobe) (vgl. US Patent 5,487,973 und Nilsen, T.W., Grayzel, J. und Prensky, W. (1997) J. theor. Biol. 187: 273-284). Dendrimere sind hochverzweigte Strukturen, die vorzugsweise aus Nukleinsäuren bestehen und aus der sequenziellen Hybridisierung monomerer Strukturen hervorgehen. Ein Monomer ist ein Heterodimer, der aus zwei Einzelstrang-Nukleinsäuren besteht, die eine Doppelstrang-Taile und vier Einzelstrang-Armen bilden. Ein Dendrimer ist aus der sequenziellen Bindung solcher Monomere in mehreren Bindungsebenen zusammengesetzt: Die erste Bindungsebene besteht aus vier Monomeren mit zwölf Einzelstrang-Armen. Die zweite Ebene besteht aus zwölf Monomeren mit 36 Einzelstrang-Armen. Die sechste Ebene besteht aus 972 Monomeren mit 2916 freien Einzelstrang-Armen. An einen der Einzelstrang-Arme können zum einen spezifische Antikörper oder spezifische Sonden wie Nukleinsäuren angekoppelt werden. An den anderen Einzelstrang-Arm hingegen können spezifische Markierungssignale wie z.B. fluoreszierende Farbstoffe, oder radioaktive Substanzen gekoppelt werden. Der Einsatz der Dendrimere zum Nachweis von seltener DNA oder RNA kann entweder direkt oder indirekt nach Amplifikation durch z.B. PCR, RT-PCR oder NASBA erfolgen.

Die angeschlossenen Nachweisverfahren können auf folgenden Gebieten zum Einsatz kommen:

Der Nachweis der Tumorzellen kann direkt als Tumormarker eingesetzt werden.

In Staginguntersuchungen kann die Anzahl der nachgewiesenen zirkulierenden Tumorzellen mit dem klinischen Bild korreliert

und ein individuelles Tumorstaging festgelegt werden. Nach Entfernung des Primärtumors kann der Patient regelmäßigen Rezidivkontrollen unterzogen und bei positivem Befund sofort behandelt werden. Weitere Anwendungsmöglichkeiten sind der Nachweis von residualen Tumorzellen im Knochenmark von Patienten, die sich einer Hochdosis-Strahlentherapie unterziehen müssen oder von zirkulierenden Tumorzellen im Rahmen von ex-vivo und in-vivo Gentherapieansätzen.

Durch die Gewinnung von zirkulierenden Tumorzellen können Therapien auf ihre Wirksamkeit hin überprüft und gegebenenfalls abgeändert werden. Dies ist insbesondere dadurch möglich, daß man nach Gewinnung von Tumorzellen, direkt oder nach Kultur und Expansion, die individuelle Resistenzlage der Tumorzellen auf ein Zytostatikum überprüfen und alternative Präparate austesten kann. Außerdem besteht die Möglichkeit an den gewonnenen Tumorzellen neue Therapeutika zu testen.

Einen besonderen Stellenwert wird dem Verfahren im Rahmen von Tumurvorsorgeuntersuchungen beigemessen, da mit einer erheblich früheren Diagnose und bei sofortiger Therapie mit längeren Überlebensraten zu rechnen ist. Weitere Anwendungen liegen in der Tumorstoffwechselherstellung und der Gentherapie.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, worin die Tumorzellen, wie vorstehend beschrieben aus der Körperflüssigkeit angereichert und bevorzugt gleichzeitig unerwünschte Zellen abgereichert werden.

In der immunzytologischen/immunzytochemischen Diagnostik werden z.B. zirkulierende Tumorzellen in Blut und Knochenmark durch spezifische Antikörper nachgewiesen. Dazu werden ca. $1 - 2 \times 10^6$ mononukleäre Zellen (MNC) mittels einer Zentrifuge auf einen Objektträger gebracht, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet (Zhong et al. Tumordiagn. u. Ther. (1999) 20: 39). Eine Blutprobe enthält zwischen $1 - 3 \times 10^6$ MNC/ml. Ausgehend von einer mittleren Menge von 2×10^6 MNC/ml, enthalten 20 ml

Blut ca. 40×10^6 MNC, die auf 20 - 40 Objekträgern untersucht werden müßten. Unsere Untersuchungen zeigen, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren aus 20 ml Blut ca. 1×10^5 Zellen angereichert werden können. Das bedeutet, daß die Auswertung der gewonnenen Tumorzellfraktion aus bis zu 200 ml Blut oder Knochenmark auf einem Präparat erfolgen kann.

An diesem Beispiel wird verdeutlicht, daß das erfindungsgemäße Verfahren entscheidende Bedeutung besonders in Hinblick auf folgende Faktoren hat: 1. Wirtschaftlichkeit: Einsparung von Zeit und Reagentien, 2. Qualität der Ergebnisse: z.B. durch Erhöhung der Signal/Noise-Ratio, 3. Erschließung bisher nicht durchführbarer zell- oder molekularbiologischer Untersuchungen der zirkulierenden Tumorzellen: z.B. Einzel-Zell-PCR-, FISH- und Gene-Array-Scanner-Analysen und 4. Automatisierung und Miniaturisierung der Nachweisverfahren: z.B. HTS (High Througput Systeme) und die Nanotechnologie.

Nachdem im Rahmen einer manifesten Mikrometastasierung die Wahrscheinlichkeit einen positiven Befund zu erheben, signifikant verbessert wird, bietet das erfindungsgemäße Verfahren zudem entscheidende Vorteile in Bezug auf eine Standardisierung der Detektion von Tumorzellen sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut, wie sie z.B. von der ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engeneering) Working Group for Standardization of Tumor Cell Detection bei Borgen et al. in Cytotherapy (1999) 1: 377 gefordert wird.

Wie erwähnt, können einzelne Schritte oder mehrere Einzelschritte innerhalb des erfindungsgemäßen Anreicherungsverfahrens oder das ganze Verfahren selbst automatisiert werden. Für eine Automatisierung des Verfahrens eignen sich sämtliche technischen Verfahren in welchen die notwendigen Manipulation automatisch durch Roboter bzw. eigens konzipierte Maschinen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden können. Weiterhin eignen sich Systeme in welchen die einzelnen Reaktionsschritte in minimalen Volumina durchgeführt

werden können. Beispiele hierfür sind High Throughput Systeme (HTS) sowie Systeme der Nanotechnologie.

Beispielsweise erlaubt die Verwendung von Mikrotiterplatten einen höheren Automatisierungsgrad. Im Sinne des erfindungsgemäßen Anreicherungsverfahrens kann beispielsweise das gesamte Spektrum der gängigen Diagnostik wie z.B. mikroskopische, immunzytologische/immunzytochemische, biochemische und/oder molekularbiologische Verfahren auf Mikrotiterplattenebene durchgeführt werden. Mikrotiterplatten erlauben für den Fachmann die gleichen Manipulationen, mit dem Unterschied, daß mehrere Proben gleichzeitig, unter standardisierten Bedingungen und in schnelleren Zeiträumen verarbeitet werden können.

Im Sinne der Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens, können beispielsweise für den immunzytologischen/immunzytochemischen Nachweis, unterschiedliche Blut- oder Knochenmarkproben, nach einer erfolgten Auftrennung, getrennt zu einem Cytospin-Präparat verarbeitet oder alternativ direkt auf Mikrotiterplatten zentrifugiert werden. Ein Cytospin-Präparat hat eine Grundfläche von ca. 240 mm^2 auf die 1×10^6 Zellen zentrifugiert werden. Als Mikrotiterplatten eignen sich beispielsweise 12 Kammer-, 24 Kammer- bzw. 48 Kammer-Platten mit einer Kammerfläche von jeweils ca. 350 mm^2 , 190 mm^2 bzw. 110 mm^2 .

Bevorzugt werden für die immunzytologische/immunzytochemische Diagnostik 12 Kammer- oder 24 Kammer-Platten und besonders bevorzugt 24 Kammer-Platten verwendet. Weiterhin werden bevorzugt Mikrotiterplatten verwendet, in denen die Kammern als Streifen in einen Rahmen eingesetzt werden können, z.B. 3 Streifen, à 4 Kammern/12 Kammer-, 4 Streifen à 6 Kammern/24 Kammer- und 6 Streifen à 8 Kammern/48 Kammer-Platte.

Besonders bevorzugt werden Mikrotiterplatten, die statt eines Plastikbodens einen Glasboden haben, da sich Glas für verschiedene Anwendungen besser als Plastik eignet (beispielsweise zur Fixierung der Zellen). Analog zu den

Cytospin-Präparaten können die Präparate in Mikrotiterplatten durch eine computergestützte Bildanalyse ausgewertet werden.

Analog zur den Verfahren im Bereich der Immunzytologie /Immunzytochemie können die molekularbiologischen Diagnoseverfahren ebenfalls auf Mikrotiterplatten durchgeführt werden, mit dem Unterschied, daß nach der Auftrennung der Zellen wesentlich kleinere Volumina verarbeitet werden und somit Mikrotiterplatten bis hin zu HTS- (High Throughput System) Mikrotiterplatten bzw. Systeme der Nanotechnologie verwendet werden und die Manipulationen durch Roboter bzw. eigens konzipierte Maschinen unter standardisierten Bedingungen in minimalen Volumina durchgeführt werden können.

Im Rahmen der Automatisierung des erfindungsgemäßen Verfahrens können Einsätze auf die Mikrotiterplatten gesetzt werden, die es erlauben, daß die Auftrennung der Zellen in kleineren Volumina, analog zu einem Zentrifugationsgefäß, direkt auf einer Mikrotiterplatte durchgeführt werden können. Ein solcher Aufsatz, in dem die einzelnen Kammern analog zu den beschriebenen Zentrifugationsgefäßen mit Klappen versehen sind, ist zum besseren Verständnis beispielhaft in Figur 5 dargestellt.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch Verfahren zum semi- oder vollautomatischen Nachweis von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, worin die Tumorzellen wie vorstehend beschrieben aus einer Körperflüssigkeit angereichert wurden.

In einer speziellen Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens können auch Tumorzellen aus Körperflüssigkeit isoliert und beispielsweise zu Forschungs- und Therapiezwecken kultiviert werden. Zur Kultur eignen sich sämtliche Systeme wie auch Systeme der Nanotechnologie. In diesen Systemen können die Kulturen von Tumorzellen unter optimierten Bedingungen in minimalen Volumina semi- bzw. vollautomatisch durchgeführt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch Verfahren zur Kultur von Tumorzellen, die unter Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens gewonnen wurden.

In einer speziellen Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens können auch Tumorzellen beispielsweise aus dem Knochenmark bzw. aus dem peripheren Blut abgereichert werden, z.B. wenn der Spender zum Zwecke der Erhöhung des Blutstammzell-Gehaltes mit Wachstumsfaktoren behandelt wurde.

Eine Anreicherung von Blutstammzellen wird routinemäßig sowohl aus dem Blut als auch aus dem Knochenmark zum Zwecke der Blutstammzelltransplantation durchgeführt. Dabei kann es sich sowohl um eigene (autologe) oder fremde (allogene) Blutstammzellen handeln. Die autologe wie auch allogene Blutstammzelltransplantation wird besonders im Rahmen der Hochdosistherapie (z. B. Chemo- bzw. Strahlentherapie) von Tumorerkrankungen als auch zur Therapie von Erkrankungen des blutbildenden Systems und von Autoimmunerkrankungen (z.B. Rheuma) angewendet. Im Falle einer Anreicherung von Blutstammzellen aus dem Knochenmark, wird das Ausgangsmaterial direkt durch Entnahme von Knochenmark, z. B. aus dem Beckenkamm gewonnen. Im Falle einer Anreicherung von Blutstammzellen aus dem peripheren Blut wird die Konzentration der Blutstammzellen im Blut zuerst durch die Gabe von Wachstumsfaktoren erhöht. Mononukleäre Zellen (MNC) werden nachfolgend mittels Leukapherese gewonnen. Die gewonnenen mononukleären Zellen werden dann einem Anreicherungsverfahren für Blutstammzellen unterzogen. Diese angereicherte Blutzell-Fraktion wird dann mit DMSO versetzt und bis zur Transplantation eingefroren.

In Falle der autologen Blutstammzelltransplantation ist die Gefahr der Transplantation von kontaminierenden Tumorzellen besonders groß und gefährdet den Therapieerfolg. Es ist deshalb wünschenswert vor der Transplantation die gewonnene MNC-Fraktion auf das Vorhandensein von Tumorzellen zu überprüfen und vorhandene Tumorzellen abzureichern.

Es wurde nun gefunden, daß Blutstammzellen, die als Oberflächenmarker das CD34 Antigen tragen, Telomerase-positiv sind, und eine Dichte von ca. $1,061 \text{ g/ml} \pm 0,0005 \text{ g/ml}$ haben. Diese Dichte liegt so nahe an der besonders bevorzugten Dichte von $1,060 \text{ g/ml} \pm 0,0005 \text{ g/ml}$, die im erfindungsgemäßen Verfahren zur Anreicherung von Tumorzellen verwendet wird, daß eine perfekte Trennung von Telomerase-positiven Tumorzellen von Telomerase-positiven Nicht-Tumorzellen, nach einer therapeutischen Mobilisierung von CD 34+ Blutstammzellen in das periphere Blut, nicht immer vollständig und sicher gewährleistet werden kann.

Im Falle des Telomerase-Nachweises aus dem peripheren Blut, belegen durchgeführte Versuche, daß bei allen Blutproben der untersuchten Probanden, selbst nach einer Auftrennung mit einem Zellseparationsmedium mit einer Dichte von $1,065 \text{ g/ml}$, die aus der Interphase gesammelte Zellfraktion durchgehend Telomerase-negativ war. Das bedeutet, daß bei den untersuchten Probanden der Anteil von CD 34+ Zellen, bzw. die Telomerase-Aktivität der CD 34+ Zellen im peripheren Blut unter der Nachweisgrenze lag (Beispiel 2).

Nach der Mobilisierung von Blutstammzellen in das periphere Blut ist es wahrscheinlich, daß die gesammelte Zellfraktion bei einer Trennung mit einer Dichte von $1,060 \pm 0,0005 \text{ g/ml}$, Telomerase-positiv wird und nicht mehr zwischen Telomerase-positiven Tumorzellen und Telomerase-positiven Nicht-Tumorzellen unterscheiden werden kann. Dies liegt darin begründet, daß durch die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren zum einen die Menge der CD 34+ Blutstammzellen und zum anderen auch die Telomerase-Aktivität dieser Zellen zugenommen hat. Ein Teil dieser CD 34+ Blutstammzellen wird nicht vollständig abgereichert und somit werden die in der Interphase befindlichen Telomerase-positiven Tumorzellen durch Telomerase-positiv CD 34+ Nicht-Tumorzellen kontaminiert.

Dieses Problem kann erfindungsgemäß dadurch gelöst werden, daß in diesem Falle das vorstehend beschriebene Verfahren

dahingehend abgewandelt wird, in einem ersten Schritt die CD 34+ Blutstammzellen anzureichern und die unerwünschten Blutzellen in einem hohen Maße abzureichern. In einem zweiten Schritt werden dann entweder die Tumorzellen von den CD 34+ Blutstammzellen oder die CD 34+ Blutstammzellen von den Tumorzellen durch Immunadsorption abgetrennt. Es wurde gefunden, daß eine besonders gute Trennleistung, im Sinne einer Abreicherung von unerwünschten Blutzellen bei gleichzeitiger Anreicherung von CD34+ positiven Blutstammzellen und Tumorzellen mit einer Erhöhung der Dichte des Zellseparationsmediums auf einen Bereich von 1,061 bis 1,065 g/ml und besonders bevorzugt von etwa 1,062 g/ml, insbesondere 1,062 g/ml \pm 0,0005 g/ml erzielt wird.

Der zweite Trennschritt erfolgt durch eine weitere Anreicherung der gewünschten Zellpopulationen bzw. Abreicherung unerwünschter Zellen wie z.B. Tumorzellen in Blutstammzell-Präparationen zu diagnostischen wie therapeutischen Zwecken, und wird durch ein nachgeschaltetes An- oder Abreicherungsverfahren z.B. unter Verwendung von Immunadsorptionsverfahren mit spezifischen Antikörpern durchgeführt.

Durch das erfindungsgemäße Trennverfahren kann ein nachgeschaltetes Abreicherungsverfahren wesentlich kostengünstiger angewendet werden, nachdem ein erheblicher Anteil der unerwünschten Blutzellen bereits abgereichert worden ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren insbesondere zum Nachweis und zur therapeutischen Abreicherung von Tumorzellen aus Blutstammzellen von Knochenmark und peripherem Blut, worin die Tumorzellen und Blutstammzellen in einer Fraktion wie vorstehend beschrieben angereichert und die Blutstammzellen oder Tumorzellen in einem zweiten Schritt entweder angereichert oder abgereichert werden.

Nachdem das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft im Rahmen der therapeutischen autologen Blutstammzellgewinnung eingesetzt

werden kann, ist es naheliegend, dieses Verfahren auch zur allogenen Blutstammzellgewinnung einzusetzen.

Das erfindungsgemäße Anreicherungsverfahren von allogenen und autologen Blutstammzellen bewirkt, daß die Blutstammzellen erheblich besser angereichert und unerwünschte Blutzellen wesentlich besser abgereichert werden, als es mit den bisher üblichen Methoden durchführbar ist. Dies hat insbesondere den Vorteil, daß die Menge von DMSO, die zur Kryokonservierung der Zellen erforderlich ist, erheblich verringert werden kann. Somit können die durch DMSO verursachten Komplikationen, die bei der Blutstammzelltransplantation entstehen, verringert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur therapeutischen Anreicherung von allogenen bzw. autologen Blutstammzellen von Knochenmark und peripherem Blut, worin bei der autologen Blutstammzellgewinnung die Tumorzellen und Blutstammzellen in einer Fraktion wie vorstehend beschrieben angereichert und die Blutstammzellen oder Tumorzellen in einem zweiten Schritt entweder angereichert oder abgereichert werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist. Hierzu umfaßt der Kit ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,055 bis 1,065 g/ml aufweist, bevorzugt im Bereich von 1,057 bis 1,063 g/ml, bevorzugter von 1,059 bis 1,061 g/ml und besonders bevorzugt von etwa 1,060 g/ml, insbesondere 1,060 g/ml \pm 0,0005 g/ml sowie gegebenenfalls ein Zentrifugationsgefäß.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Anreicherung von Blutstammzellen aus peripherem Blut und dem Knochenmark, der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist. Hierzu umfaßt der Kit ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,061 bis 1,065 g/ml aufweist und bevorzugt von etwa 1,062 g/ml,

insbesondere 1,062 g/ml \pm 0,0005 g/ml sowie gegebenenfalls ein Zentrifugationsgefäß.

Um das routinemäßige Arbeiten mit dem Kit zu erleichtern, kann das Zentrifugationsgefäß eine poröse Barriere oder Klappe bevorzugt mit einer Dicke von 1-10 mm, vorzugsweise ca. 1-5 mm aufweisen, die das Zentrifugationsgefäß in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilt. Die poröse Barriere kann vorteilhaft eine Porengröße von 20-100 μ m, vorzugsweise 20-30 μ m aufweisen und besteht bevorzugt aus einem hydrophoben Material.

Die Klappe öffnet sich vorteilhaft von ihren äußeren Rändern aus in das untere Kompartiment und besteht bevorzugt aus einem hydrophoben Material. Die Klappe ist dabei analog zur Barriere a) starr mit dem Zentrifugationsgefäß verbunden, b) starr mit dem Zentrifugationsgefäß verbunden, wobei das Zentrifugationsgefäß selbst in 2 Teile, in einen unteren und in einen oberen Teil, zerlegbar ist und die Klappe den Boden des oberen Teiles bildet, oder c) starr mit einem Einsatz verbunden, der in das Zentrifugationsgefäß eingeführt werden kann, wobei die Klappe den Boden des Einsatzes bildet.

Die Größe des in dem Kit enthaltenen Zentrifugationsgefäßes sollte an die Menge der Körperflüssigkeit angepaßt sein, aus der die Tumorzellen angereichert werden sollen. Beispielsweise kann das Zentrifugationsgefäß ein Volumen von 1-500 ml, bevorzugt 1-50 ml und besonders bevorzugt 15-50 ml aufweisen. Bevorzugt ist das Zentrifugationsgefäß verschließbar. Das Zentrifugationsgefäß ist bevorzugt steril bzw. sterilisierbar und kann dabei aus festen unverformbaren oder auch verformbaren Materialien (Beutel) bestehen oder eine Mikrotiterplatte sein.

In einer alternativen Ausführungsform sollte die Größe des in dem Kit enthaltenen Zentrifugationsgefäßes an die Menge der Körperflüssigkeit angepaßt sein, aus der die Blutstammzellen angereichert werden sollen. Beispielsweise kann das Zentrifugationsgefäß ein Volumen von 50-500 ml, bevorzugt 50-

250 ml und besonders bevorzugt 50-200 ml aufweisen. Bevorzugt ist das Zentrifugationsgefäß verschließbar. Das Zentrifugationsgefäß ist steril bzw. sterilisierbar und kann dabei aus festen unverformbaren oder auch verformbaren Materialien (Beutel) bestehen.

Besonders vorteilhaft befindet sich das Zellseparationsmedium in dem Kit bereits im unteren Kompartiment des Zentrifugationsgefäßes, damit dieses bei Routineuntersuchungen einfach und schnell eingesetzt werden kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Kit ein Zellseparationsmedium, das mit einem Farbstoff versetzt ist, der die Interphase zwischen Zellseparationsmedium und Interphase nach der Zentrifugation leichter sichtbar macht.

Schließlich umfaßt die Erfindung auch vorteilhaft für das erfindungsgemäße An- oder Abreicherungsverfahren einsetzbare Zentrifugationsgefäße, die eine wie vorstehend beschriebene Klappe aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet den Vorteil, daß Telomerase-positive nicht-Tumorzellen einfach und sicher von den anzureichernden Tumorzellen abgetrennt werden, so daß in anschließenden Nachweisverfahren keine falsch-positiven Ergebnisse durch Telomerase-aktive nicht-Tumorzellen erhalten werden. Darüber hinaus sind nur wenige Arbeitsschritte für die Anreicherung und Isolierung von Tumorzellen aus Körpergewebe notwendig, so daß dadurch die Prozessierung von größeren Mengen von Probenmaterial möglich wird. Die Kosten für die notwendigen Materialien sind beispielsweise gegenüber der Verwendung spezifischer Antikörper und der anschließenden Trennung mittels geeigneter Apparaturen signifikant geringer.

Darüber hinaus zeigte die Untersuchung von 10 unterschiedlichen Zelllinien, die von Tumorgeweben, wie Melanom, Prostata-, Brust-, Lungen-, Leber- und Colorektal-Karzinomen abgeleitet

waren, daß die Zellen all dieser Zelllinien in ihrer Mehrzahl durch das erfindungsgemäße Verfahren angereichert wurden.

Von den anliegenden Figuren zeigt:

Figur 1 das Ergebnis einer Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Dichte von Percoll. In einem Temperaturbereich von ca. 0°C-8°C beträgt die Dichte der hergestellten Percoll-Arbeitslösung $1,060 \pm 0,005$ g/ml. Bei einer Umgebungstemperatur von mehr als 8°C beginnt die Percoll-Arbeitslösung stetig zu expandieren und die ursprünglich eingestellte Dichte signifikant abzunehmen.

Figur 2 zeigt ein Beispiel eines Zentrifugationsgefäßes (1) mit einem Verschuß (2) und einem Einsatz (3) mit einer Klappe (4), die an einer Querverstrebung (5) fixiert ist. Die Querverstrebung (5) ist fest mit dem Einsatz (3) verbunden. Die Klappe (4) bildet den Boden des Einsatzes (3). Im einfachsten Falle ist die Klappe beispielsweise ein Plättchen, das durch die Zentrifugation auf zwei Seiten über die Querverstrebung (5) in das vorgelegte Zellseparationsmedium gebogen wird. Die Querverstrebung (5) unterstützt auch den vollständigen Klappenschluß nach der Zentrifugation. Das Zentrifugationsgefäß (1) muß während der Zentrifugation mit dem Verschuß (2) verschlossen sein, um zu verhindern, daß das vorgelegte Zellseparationsmedium an dem Spalt (s) zwischen Zentrifugationsgefäß (1) und Einsatz (3) nach oben gedrückt wird. Zusätzlich kann die Klappe (4) beispielsweise mit zwei zusätzlichen Füßchen (6) ausgestattet sein, so daß der Einsatz (3) auf die Querverstrebung (5) und die Füßchen (6) aufrecht abgestellt werden kann. Gleichzeitig begünstigen die Füßchen (6) die Klappenöffnung, da sie die äußeren Ränder der Klappe (4) zusätzlich beschweren.

Figur 3 zeigt ein Beispiel eines Zentrifugationsgefäßes (7), das im Unterschied zu dem in Figur 2 gezeigten Zentrifugationsgefäß (1) aus zwei Teilen besteht. Der obere Teil (8) kann auf einen unteren Teil (9) aufgesteckt werden.

Die Klappe (4) bildet den Boden, der Verschluß (2) den Deckel des oberen Teiles.

Figur 4 zeigt ein Beispiel der Funktionsweise eines Klappen-Einsatzes in einem Zentrifugationsgefäß wie er z.B. für die Separation von Tumorzellen aus Blut oder Knochenmark verwendet wird. a) Die zu untersuchende Blut- oder Knochenmarksprobe (bk) enthält vereinfacht dargestellt, Erythrozyten (rbc), Leukozyten (wbc) und Tumorzellen (tc) und wird nach Entnahme direkt in den Einsatz (3) gegeben, dessen Boden durch die Klappe (4) dicht verschlossen ist. b) Der Einsatz (3) wird dann beispielsweise in ein 50 ml Zentrifugationsgefäß (1) eingeführt, in dem bereits ein entsprechendes Volumen des Zellseparationsmediums (sm) vorgelegt wurde. c) Während der Zentrifugation werden durch die angelegte Zentrifugalkraft die beiden Seiten der Klappe (4) über die Querverstrebung (5) nach unten in das Zellseparationsmedium (sm) hinein gebogen. Dies bewirkt, daß die Flüssigkeiten (bk) und (sm) zusammentreffen und das Zellseparationsmedium (sm) durch die dichteren Zellen (rbc) und (wbc) nach oben verdrängt wird, womit die Tumorzellen (tc), welche eine geringe Dichte als das vorgelegte Zellseparationsmedium (sm) haben, auf einer Ebene oberhalb der Klappe (4) zu liegen kommen. d) Nach der Zentrifugation ist die Klappe (4) wieder dicht verschlossen, so daß e) der Einsatz (3) mit den Tumorzellen (tc) einem geringen Anteil Zellseparationsmedium (sm) und Plasma (p) f) und g) in ein neues Zentrifugationsgefäß überführt werden kann. Durch eine erneute Zentrifugation h) werden die Tumorzellen (tc) pelletiert i) und können dann j) weiter gereinigt und den nachfolgenden Untersuchungen zugeführt werden.

Figur 5 zeigt ein Beispiel eines Klappen-Einsatzes für eine Mikrotiterplatte, mit einer Vielzahl Klappen (4).

Figur 6 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von Blut eines gesunden Spenders (A) und Blut des gleichen Spenders gemischt mit GFP-transfizierten Zellen der Melanom-Zelllinie T289 (B, C)

nach Tumorzellanreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,070 g/ml.

Figur 7 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von Blut gesunder Spender, das mit Tumorzellen einer Prostata-Karzinom-(A) und Mamma-Karzinom-Zelllinie (B) gemischt wurde, nach Tumorzellanreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,065 g/ml.

Figur 8 zeigt die Wiederfindungsrate von GFP-transfizierten Melanomzellen, die zu Blut unterschiedlicher (A, B) gesunder Spender gemischt wurden, nach Anreicherung mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,065 g/ml.

Figur 9 zeigt ein Flußdiagramm für die RT-PCR.

Figur 10 zeigt die Wiederfindungsrate gespikter Tumorzellen der Brustkrebs-Zell-Linie MDMB 435s im peripheren Blut.

Figur 11 zeigt die Wiederfindungsrate von unterschiedlichen Karzinomzell-Linien.

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

Beispiel 1

In einem silikonisierten Kunststoff-Zentrifugationsgefäß wurde venöses Blut (5-20 ml), mit EDTA versetzt (3,9 mM Endkonzentration, pH 8,0) und mit 1 Volumen PBS gemischt. Das Blut/PBS-Gemisch wurde anschließend auf 5-10 ml Percoll mit einer Dichte von 1,065 g/ml gegeben und bei langsamer Beschleunigung und ohne Bremse für 30 Minuten bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes wurde anschließend für 5-10 min in flüssigem Stickstoff inkubiert. Dadurch wurde während des Absaugens der Zellen, die sich an der Interphase im Übergang zwischen dem Percoll und dem darüberliegenden Plasma/PBS-

Gemisch befanden, eine Kontamination mit Zellen des Pellets verhindert. Die Zellen der Interphase, bei denen es sich vorwiegend um Thrombozyten und um im Blut zirkulierende Tumorzellen handelte, wurden anschließend in ein neues silikonisiertes Kunststoff-Zentrifugationsgefäß übertragen und für 10 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Für die anschließende RT-PCR-Untersuchung wurde das Zellpellet in einem Guanidium-Isothiocyanat-Puffer aufgenommen, wodurch die Zellen lysiert wurden und einer RNA-Isolierung unterzogen werden konnten.

Beispiel 2

Mit Hilfe von sogenannten Spiking-Experimenten, bei denen Tumorzellen verschiedener Zelllinien zum Blut normaler Spender gemischt wurden und die Tumorzellen anschließend re-isoliert und in der RT-PCR untersucht wurden, wurde gezeigt, daß in Abhängigkeit der verwendeten Zelllinie die Telomerase-Aktivität von etwa 1-4 gespikter Tumorzellen/ml Blut nachgewiesen werden kann. Die RT-PCR wurde analog zu der in Beispiel 4 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen der zu spikenden Tumorzelllinien entsprechend der Angaben des Herstellers (ATCC, *American Tissue Cell Culture*) bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden anschließend trypsiniert und in Medium (RPMI 1640) gewaschen. Nach Entnahme eines 10 µl Aliquots, das 1:1 mit Tryptan-Blau gemischt wurde, wurden die lebenden Zellen in einer Zählkammer bestimmt und die entsprechende Zellkonzentration wurde berechnet. Anschließend wurde die Zellsuspension verdünnt und ein Volumen, das einer bestimmten Zellzahl entspricht, mit dem Blut gesunder Blutspender gemischt. Als Kontrolle diente Blut dem keine Tumorzellen zugesetzt wurden. Die Anreicherung der gespikten Tumorzellen wurde einmal zum Vergleich mit einem Zellseparationsmedium einer Dichte von 1,070 g/ml und nach dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurden anschließend mikroskopische, durchflußzytometrische und RT-PCR-Analysen durchgeführt.

a) Vergleichsversuch

Figur 6 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR-Analyse von 20 ml Blut eines gesunden Spenders (A) und 20 ml Blut des gleichen Spenders gemischt mit GFP-transfizierten Zellen der Melanom-Zelllinie T289 (B, C). Das Blut wurde auf Percoll einer Dichte von 1,070 g/ml geschichtet, zentrifugiert und anschließend wurden die Zellen analysiert. Die katalytische Untereinheit der Telomerase (hTRT) ist im normalen Blut nicht nachweisbar (A), während bei 1 und 2 gespickten Melanomzellen pro ml Blut hTRT nachweisbar ist (B, C). Bei der verwendeten Percoll-Dichte von 1,070 g/ml sind jedoch noch hinreichend viele Telomerase-aktive Leukozyten in der Interphase vorhanden, wodurch die RNA-Komponente (hTR) auch im ungespickten Blut nachweisbar ist. Für die Präsenz von aktivierten und wahrscheinlich deshalb auch Telomerase-aktiven Leukozyten in der Fraktion der isolierten Zellen spricht auch die Tatsache, daß CD69, ein früher Aktivierungsmarker in B- und T-Zellen, in allen Blutproben nachweisbar ist (A-C). Der Tumormarker CEA (Carcinoembryonic Antigene) ist sowohl im ungespickten als auch im gespickten Blut negativ (A-C). GFP (Green Fluorescent Protein), der als zusätzlicher Marker für die gespickten Tumorzellen verwendet wurde, ist im ungespickten Blut nicht nachweisbar (A). Da nur etwa 50% der transfizierten T289-Melanomzellen GFP exprimieren, ist das Protein nur in bis zu 2 gespickten Tumorzellen pro ml Blut nachweisbar (B). Aktin diente als RT-PCR-Positivkontrolle (Aktin) und im Ansatz ohne RT-Reaktion als Negativkontrolle (Aktin ØRT). Die PCR-Amplifikation genomischer DNA untransfizierter T289-Zellen führt mit den spezifischen Primerpaaren für hTRT, GFP und CD69 zu keinen Amplifikaten.

b) erfindungsgemäßer Versuch

Figur 7 zeigt RT-PCR-Analysen von Blut gesunder Spender das mit Tumorzellen einer Prostata-Karzinom- (A) und Mamma-Karzinom-Zelllinie (B) gemischt, auf Percoll einer Dichte von 1,065 g/ml geschichtet, zentrifugiert und anschließend analysiert wurde.

Die RNA-Komponente der Telomerase (hTR) ist im Unterschied zu der Verwendung von Percoll mit einer Dichte von 1,070 g/ml im ungespikten Blut nicht nachweisbar (vgl. Fig. 1). In den Proben mit 2 gespikten Prostata-Karzinomzellen (A) bzw. mit 4 gespikten Mamma-Karzinomzellen (B) pro ml Blut kann hTR nachgewiesen werden (schwarzer Pfeil). Im Unterschied zur Melanom-Zelllinie T289 konnte bei diesen Tumorzellen keine (A) bzw. erst bei 10^4 Tumorzellen (B) eine Expression der katalytischen Untereinheit (hTRT) nachgewiesen werden. Weder der Prostatazell-spezifische Marker PSA (Prostate Specific Antigene) noch der Epithelzell-spezifische Marker CK20 (Cytokeratin 20) ist in den entsprechenden Tumorzellen nachweisbar. Aktin dient als RT-PCR-Positivkontrolle.

Figur 8 zeigt die Wiederfindungsraten von GFP-transfizierten Melanomzellen (T289), die zu Blutproben gesunder Spender gemischt (gespikt) wurden. Die gespikten Blutproben wurden anschließend auf Percoll einer Dichte von 1,065 g/ml geschichtet, zentrifugiert und die Anzahl der re-isolierten Tumorzellen (Wiederfindung) wurde mikroskopisch (-●-) und/oder durchflußzytometrisch (-▲-) bestimmt. Da nur etwa 75% für Probe A bzw. 50% für Probe B der GFP-transfizierten T289-Zellen im Durchflußzytometer nachweisbar waren, wurden die Wiederfindungsraten entsprechend korrigiert. Die Wiederfindungsrate gespikter Tumorzellen ist abhängig vom jeweiligen Blutspender (die Blutproben von A) und B) stammen von unterschiedlichen Spendern), der verwendeten Zelllinie und verhält sich umgekehrt proportional zur Anzahl der gespikten Tumorzellen. Möglicherweise führt eine Abstoßungs-Reaktion der entsprechenden hämatopoetischen Zellen zur Lyse, Aggregation und schließlich zum Verlust der gespikten allogenen Tumorzellen. B) zeigt darüber hinaus, daß die Anzahl der tatsächlich gespikten Tumorzellen (-■-) zwischen 6% - 37% geringer ist als die theoretisch berechnete Anzahl gespikter Tumorzellen (-◆-).

Unter Hinzunahme hier nicht dargestellter Untersuchungen mit Lungen- und Mamma-Karzinomzellen ergibt sich eine

durchschnittliche Wiederfindungsrate mit der erfindungsgemäßen Anreicherungsmethode von $46\% \pm 20\%$ für 4-512 gespikte Zellen ($n=16$) und für ≤ 50 gespikte Zellen von $54\% \pm 20\%$ ($n=15$).

Damit liegt die Wiederfindungsrate des erfindungsgemäßen Tumorzellanreicherungsverfahrens etwa im Bereich von magnetischen Zell-Separatoren wie MACS für die eine Wiederfindungsrate von etwa 30-58% angegeben wird.

Beispiel 3

Erste klinische Untersuchungen bei Melanom-Patienten haben gezeigt, daß in 43% der Patienten mit akuten Metastasen und in 16% der Patienten ohne offenkundige akute Tumorerkrankung (beispielsweise nach Resektion der Tumoren bzw. nach Therapie) die Telomerase in den mit dem erfindungsgemäßen Verfahren angereicherten disseminierten zirkulierenden Tumorzellen des Blutes nachgewiesen werden konnte. Parallel untersuchte Blutproben von 10 gesunden Spendern waren dagegen negativ.

Damit zeigte bereits diese Studie an Melanom-Patienten eine eindeutige Korrelation der Telomerase-Aktivität von disseminierten zirkulierenden Tumorzellen im Blut und dem Metastasen-Status der entsprechenden Tumorpatienten.

Beispiel 4

4.1 Isolierung von zellulärer RNA

Die Isolierung von totaler zellulärer RNA erfolgte nach Standardverfahren [Chomczynski et al. (1987) Anal Biochem 162, 156; Sambrook, J. et al. (1989). Cold Spring Harbor, New York, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press]. Peripheres Blut wurde wie in Figur 9 gezeigt sofort nach Abnahme in RNA-Lysispuffer (4 M Guanidinium Isothiocyanat; 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 1% Mercaptoethanol) überführt und homogenisiert. Die

Gemische wurden entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -70°C gelagert.

4.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde mit dem GeneAmp® RNA-PCR-Kit (Perkin Elmer) nach Vorgaben des Herstellers wie in Figur 9 gezeigt durchgeführt. Aliquote der isolierten totalen RNA von peripherem Blut und Zelllinien wurden jeweils zuvor mit 4U DNase und 40U RNase Inhibitor (Boehringer, Mannheim) in 36 µl Ansätzen (in 100 mM Tris-HCl, pH 8.3; 50 mM KCl; 5 mM MgCl₂, 1mM dNTP-Mix und 2,5 mM Random Hexamers) bei 37°C für 30 Minuten und bei 75°C für 10 Minuten hydrolysiert und anschließend die DNase für 10 Minuten bei 90°C inaktiviert und dann das Reaktionsgemisch sofort auf Eis gegeben.

Die beiden Oligonukleotid-Primer:

5' CTACCGGAAG AGTGTCTGGA GCAAGTTGCA AAGC 3' (hTRT1) und
5' GGCATACCGA CGCACGCAGT ACGTGTCTG 3' (hTRT2)

wurden nach der von Nakamura et al. veröffentlichten Sequenz, kodierend für die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase (Nakamura et al. (1997). Science 277: 955-9) entworfen und mit einem Applied Biosystem 380A Synthesizer synthetisiert. Die Spezifität der hTRT1- und hTRT2-Primer wurde mittels Computer gestützter Homologieanalyse an den Nukleinsäuresequenzen in den GenBank-, EMBL-, DDBJ- und PDB-Datenbanken mittels BLASTN 1.4.9 MP [Altschul, S. F. et al. (1990). J Mol Biol 215: 403-410] überprüft.

Zur Abstimmung der Amplifikationsmengen wurden für jedes Experiment gleiche RNA-Mengen für die RT-Reaktion eingesetzt. Um eine Kontamination der RNA Präparationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde jede mit DNase hydrolysierte RNA-haltige Probe zuerst der unten beschriebenen PCR unterzogen und auf Amplifikation hin überprüft. Die RNA-haltige Probe, bei der

kein Amplifikationsprodukt nachweisbar war, wurde für die folgenden cDNA-Synthese- und PCR-Schritte eingesetzt. Als interne Standardkontrolle wurden Oligonukleotid-Primer für β -Aktin und den TCR eingesetzt. Die Reverse Transkriptase-Reaktion wurde an 18 μ l des DNase Verdauers unter Zugabe von 50U MuLV Reverser Transkriptase und 40U RNase Inhibitor bei 42°C für 30 Minuten durchgeführt und die Reaktion bei 99°C für 5 Minuten abgebrochen. In den Negativkontrollen wurden statt der Enzyme 4 μ l Wasser zugesetzt.

Die PCR wurde wie in Figur 9 gezeigt an 5 μ l der cDNA-Reaktion nach folgendem Programm durchgeführt: (97°C: 15 Sekunden vorwärmen); (97°C: 15 Sekunden, 70°C: 30 Sekunden [minus 0.5°C pro Zyklus], 72°C: 30 Sekunden) 10 Zyklen; (94°C: 15 Sekunden, 65°C: 30 Sekunden [minus 0.5°C pro Zyklus], 72°C: 30 Sekunden) 20 Zyklen; (94°C: 15 Sekunden, 50°C: 30 Sekunden 72°C: 30 Sekunden [plus 15 Sekunden Extension pro Zyklus], 10 Zyklen; (72°C: 7 Minuten, finale Extension).

Die Amplifikationsprodukte wurden gelelektrophoretisch auf 1.5%igem TAE Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht visualisiert und fotodokumentiert.

Beispiel 5

Es wurden weitere Spiking-Experimente, wie in Beispiel 1 und 2 beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, daß normale nicht silikonisierte Polypropylen-Zentrifugationsgefäße und Percoll mit einer Dichte von 1,060 g/ml verwendet wurden. In diesen Experimenten sollte zum einen der Grad der Abreicherung von unerwünschten Blutzellen und zum anderen der Grad der Anreicherung von Tumorzellen bestimmt werden.

Bei ca. 80%-90% Konfluenz wurden die Tumorzellkulturen der Brustkrebs-Zell-Linie MDMB 435s trypsiniert und die gewonnene Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugationsgefäß überführt und diese bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 0.5 ml resuspendiert.

100 ml der Zellsuspension (ca. 10^5 - 10^6 Zellen) wurden zur Färbung des Zellkerns mit 20 ml einer DAPI-Lösung (interkalierender Farbstoff; 1 mg 4',6'-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid/ml Dimethylsulfoxyd [DMSO]) in einem 1,5 ml Zentrifugationsgefäß gemischt und für 10 Minuten bei 37°C und bei 700 rpm in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 500 x g für 5 Minuten pelletiert, in 1 ml DPBE (1 ml 0,1% BSA und 4 mM EDTA in Dulbecco PBS) resuspendiert und erneut bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Partikel-Counters (Z2, Beckman Coulter GmbH) auf 2000 Zellen/ml DPBE eingestellt.

Triplikate von jeweils 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 70 ml der DAPI-positiven Zellsuspension wurden individuell in die Kammern einer 384-Platte pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde dann bei 700 x g für 3 Minuten zentrifugiert und die Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 25, Zeiss, Filtersatz 02, [Extinktion 358 nm, Emission 460 nm]) ausgezählt. Danach wurde eine Standardgerade (x = ml DAPI-positive Zellsuspension; y = Zellzahl) gebildet. Die r^2 -Werte der Standardgerade betrugen mindestens 0,95.

In den Spiking-Experimenten wurde in Triplikaten eine entsprechende Anzahl DAPI-positiver Zellen in 20 ml Vollblut (Bayerisches Rotes Kreuz, BRK) gemischt und das Vollblut in ein 50 ml Zentrifugationsgefäß mit einer porösen Barriere (Porengröße 20 - 100 nm) gegeben, in dessen unteren Kompartiment 15 ml Percoll mit einer Dichte von 1,060 g/ml (bei 4°C) und einer Osmolarität von 280-300 mmol/kg vorgelegt worden war. Anschließend wurde das Zentrifugationsgefäß bei 4°C und 1000 x g und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die Zellen der Interphase mit Hilfe einer 10 ml Pipette in ein frisches 50 ml Zentrifugationsgefäß überführt. Das obere Kompartiment des

ersten Zentrifugationsgefäßes wurde zweimal vorsichtig mit 15 ml DPBE ausgewaschen und die Flüssigkeit in das zweite Zentrifugationsgefäß überführt. Anschließend wurde das Zentrifugationsgefäß auf 50 ml mit DPBE aufgefüllt und bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysispuffer (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 und 0,1 mM EDTA pH 7,3) resuspendiert und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Nach Beendigung der Erythrozytenlyse, wurde das Zentrifugationsgefäß auf 50 ml mit DPBE aufgefüllt und erneut bei 200 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden dann erneut in 50 - 200 ml DPBE aufgenommen.

Anschließend wurde die Zellsuspension in zwei gleiche Aliquote aufgeteilt. Ein Aliquot wurde in die Kammer einer 24-Platte gegeben und die Anzahl der Tumorzellen in der Mikrotiterplatte unter dem Mikroskop bestimmt. Die Gesamtmenge an Zellen des zweiten Aliquots wurde mit einem automatischen Haematologie-Analysesystem (KX21, Sysmex) bestimmt.

Die Experimente mit einem Percoll-Zellseparationsmedium mit einer Dichte von 1,060 g/ml, zeigen, 1. eine Wiederfindungsrate von ca. 73%, für die gespikten Tumorzellen (5 - 320 gespikte Zellen, Figur 10) und 2. einen Abreicherungsfaktor von ca. 10^3 für Leukozyten.

Beispiel 6

Mit der Fragestellung, ob mit dem erfindungsgemäßen Verfahren auch weitere Tumorzell-Linien angereichert werden können, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt: Tumorzell-Linien wurden entsprechend der Angaben von ATCC kultiviert und, wie unter Beispiel 2 und 5 beschrieben, geerntet. Mit Hilfe eines Partikelcounters (Beckmann Coulter, Z2) wurde die Zelldichte der Suspension auf 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde 1 ml dieser Zellsuspension vorsichtig in einem 15 ml Zentrifugationsgefäß auf 5 ml Percoll mit einer Dichte von

1,060 g/ml gegeben und eine Zentrifugation bei 1000 x g und 4°C für 30 Minuten durchgeführt. Danach wurden mit einer 5 ml Pipette zwei 3 ml Fraktionen abgenommen und in jeweils zwei getrennte 15 ml Zentrifugationsgefäße überführt. Die erste Fraktion enthielt die Zellen der Interphase, die zweite Fraktion die Restzellen. Die beiden Fraktionen wurden bei 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, die Zellpellets jeweils in 1 ml DPBE resuspendiert und die Zellzahl der beiden Fraktionen in einem Partikelcounter (Beckmann Coulter, Z2) bestimmt. Figur 11 zeigt, daß die untersuchten Zell-Linien von unterschiedlichen Organen, wie Lunge (A549, SCLC-H21), Prostata (PPC-1) Brust (T47D, MDMB 435s) Colon (colo678) und Pankreas (CAPAN-2), eine Dichte von < 1,060 g/ml aufweisen und zu über 90% in der Interphase gefunden werden. Dieser Versuch zeigt, daß zumindest alle Karzinom-Zell-Linien unabhängig ihres Ursprungs eine Dichte aufweisen, die es erlaubt, daß eine Anreicherung dieser Zellen mit dem erfindungsgemäßen Verfahren durchgeführt werden kann.

Beispiel 7

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wurden bei einer Reihe von Patienten mit verschiedenen manifesten Karzinomen gleichzeitig sowohl immunzytologische/immunzytochemische Untersuchungen als auch eine RT-PCR zum Telomerase-Nachweis durchgeführt. Nach einer Aufklärung und Zustimmung der Patienten wurden bis zu 30 ml Vollblut von der Armvene abgenommen und zwischen 10 bis 20 ml mit dem erfindungsgemäßen Verfahren, wie in Beispiel 5 beschrieben, aufgereinigt und das Zellpellet zweimal in 10 ml PBS gewaschen und zuletzt in 1 ml PBS resuspendiert und 2 Aliquote gebildet. Das erste Aliquot wurde in RNA-Lysispuffer überführt und bis zur RNA-Extraktion und nachfolgender RT-PCR bei -70°C gelagert und die Reaktionen, wie in Beispiel 4 beschrieben, durchgeführt. Das zweite Aliquot wurde den immunzytologischen Färbungen zugeführt. Die Zellzahl die auf einen Objektträger aufgebracht wurden, entsprach dem Äquivalent von 10% der ursprünglich aufgereinigten Blutmenge, d.h. bei 20

ml aufgereinigtem Vollblut wurde das Äquivalent von 2 ml Vollblut konzentriert und auf den Objektträger aufgebracht.

Es wurden routinemäßig gleichzeitig 3 Färbungen durchgeführt:
1. eine Kernfärbung mit einem interkalierenden Farbstoff DAPI,
2. eine Färbung der Epithelzellen mit dem Antikörpercocktail gegen Cytokeratin (Anti-Cytokeratin Cam 5.2, B. D.) und 3. eine Färbung von weißen Blutzellen mit einem Anti-CD45-Antikörper um unspezifische Färbungen auszuschließen.

Die Zellsuspension wurde auf einen mit Poly-L-lysin versetzten Objektträger pipettiert und über Nacht bei 4°C getrocknet. Zur Fixierung der Zellen wurden diese mit 100-200 µl einer 2%igen Formaldehyd/DPBS-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3x mit DPBS (mit 0,01% NaAz, ohne EDTA) gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde auf den Objektträger bei Raumtemperatur für 15 Minuten eine 0,5% Triton X-100/DPBS- (mit 0,01% NaAz, ohne EDTA) Lösung gegeben und anschließend wiederum 3 x mit DPBS (mit 0,01% NaAz, ohne EDTA) gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen und zur Färbung der Zellkerne wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 2% BSA/DPBS (mit 0,01% NaAz, ohne EDTA) + 1 µg/ml DAPI inkubiert und 3x mit DPBS (mit 0,01% NaAz, ohne EDTA) gewaschen. 80 µl des monoklonalen Maus-Anti-Cytokeratin-Antikörpers wurde in einer 1:500-fachen Verdünnung in DPBS (mit 0,01% NaAz, ohne EDTA) für 45 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligen Waschen mit DPBS (mit 0,01% NaAz, ohne EDTA) wurde der Objektträger mit 50 µl eines Phycoerythrin-konjugierten Anti-CD45-Antikörpers (Ziege Anti-Maus-Antikörper) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 3x mit DPBS (mit 0,01% NaAz, ohne EDTA) gewaschen. Nach Hämatoxylinfärbung (50 µl, 1 min Inkubation) wurden die Objektträger 3x mit H₂O gewaschen und eingedeckt. Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen wurden stets Präparate gesunder Blutspender mitgeführt.

Die Auswertung dieser Untersuchungen zeigt, daß bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren des Gastrointestinalbereichs, wie

z.B. der Speiseröhre, Magen, Dickdarm, Rectum und Pankreas, sowie in Patienten mit Lungen- und Brusttumoren in 11 von 14 Fällen Cytokeratin-positive CD45-negative epitheliale Zellen im Blut gefunden wurden. Diese Zellen waren Clusterförmig angeordnet und z.T. von CD45-positiven Zellen umgeben, wie es für Zytospinpräparaten von zirkulierenden Tumorzellen typisch ist. Bei diesen Zellen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Tumorzellen, da Epithelzellen in dieser Häufigkeit im Blut nicht zu erwarten sind. Die RT-PCR-Untersuchungen waren bei 93% (13/14) dieser Patienten Telomerase-positiv. In Patienten mit lokal begrenzter Erkrankung ohne Anzeichen von Metastasen wurden in 50% der Fälle (3/6) zirkulierende Epithelzellen im Blut gefunden. In 67% dieser Patienten (4/6) konnte die Telomerase nachgewiesen werden. Untersuchungen an gesunden Blutspendern waren Epithelzell- und Telomerase-negativ.

Damit konnte gezeigt werden, daß nicht nur gespikte Tumorzellen verschiedener Zelllinien, sondern auch zirkulierende Tumorzellen von Patienten mit unterschiedlichen epithelialen Tumoren (Karzinome) aus dem Blut effizient angereichert werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, worin ein Zellseparationsmedium mit der Körperflüssigkeit überschichtet und zentrifugiert wird, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,055 bis 1,065 g/ml aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,059 bis 1,062 g/ml und bevorzugt von etwa 1,060 g/ml aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation bei ca. 500 bis 2.000 x g über ca. 10 bis 30 Minuten und bevorzugt bei ca. 1.000 x g über ca. 20 bis 30 Minuten durchgeführt wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium Percoll oder Ficoll bzw. percoll- oder ficollähnlich ist.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Körperflüssigkeit vor dem Überschichten eine oder mehrere Substanzen zugegeben werden, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen verhindern, und/oder die Körperflüssigkeit vor dem Überschichten von Substanzen befreit wird, die eine Aggregation von Thrombozyten an Tumorzellen fördern.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeit peripheres Blut ist.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das periphere Blut in einer gerinnungshemmenden Substanz abgenommen und vor dem Überschichten des Zellseparationsmediums mit einem Verdünnungsmedium verdünnt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das periphere Blut venöses oder arterielles Blut ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Körperflüssigkeit ausgewählt ist aus Lymphe, Urin, Exsudaten, Transudaten, Spinalflüssigkeit, Samenflüssigkeit, Speichel, Flüssigkeiten aus natürlichen oder unnatürlichen Körperhöhlen, Knochenmark und dispergiertem Körpergewebe.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das untere Viertel des Zentrifugationsgefäßes nach der Zentrifugation und vor der Abnahme der an Tumorzellen angereicherten Interphase stark abgekühlt wird, um ein Vermischen der Zellen in den verschiedenen Schichten zu verhindern.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Zentrifugation in einem Gefäß durchgeführt wird, das durch eine poröse Barriere, einen Filter, ein Sieb oder eine Klappe in ein oberes und ein unteres Kompartiment geteilt ist, wobei das Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment vorgelegt und die Körperflüssigkeit in das obere Kompartiment eingebracht wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter, das Sieb oder die Klappe eine Dicke von 0,5-10 mm, vorzugsweise von 1-5 mm aufweisen.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Porengröße von 20-100 μm , vorzugsweise 20-30 μm aufweisen.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Barriere, der Filter, das Sieb oder die Klappe aus einem hydrophoben Material bestehen oder mit einem hydrophoben Material beschichtet sind.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellseparationsmedium einen Farbstoff enthält, der das Zellseparationsmedium von der darüberliegenden Körperflüssigkeit farblich unterscheidbar macht und dadurch die Lokalisation der Interphase vereinfacht.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß nicht-Tumorzellen, die eine Telomerase-Aktivität aufweisen, von Telomerase-positiven Tumorzellen abgetrennt werden.

17. Verfahren zum Nachweis von Tumorzellen in einer Körperflüssigkeit, worin die Tumorzellen durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-16 angereichert werden.

18. Verfahren zur Kultur von Tumorzellen, worin die Tumorzellen durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-16 angereichert werden.

19. Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen aus Blutstammzellen von Knochenmark oder peripherem Blut, worin in einem ersten Schritt die Tumorzellen und Blutstammzellen durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-16 angereichert werden und in einem zweiten Schritt die Blutstammzellen oder die Tumorzellen entweder an- oder abgereichert werden.

20. Verfahren zur Anreicherung von Blutstammzellen aus Knochenmark oder peripherem Blut, worin in einem ersten Schritt die Blutstammzellen und die Tumorzellen durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-16 angereichert werden und in einem zweiten Schritt die Blutstammzellen oder die Tumorzellen entweder an- oder abgereichert werden.

21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, worin im ersten Schritt ein Zellseparationsmedium mit einer Dichte im Bereich von 1,061 bis 1,065 g/ml und bevorzugt von etwa 1,062 g/ml eingesetzt wird.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 19 bis 21, worin im zweiten Schritt die Blutstammzellen oder die Tumorzellen durch Immunadsorption entweder an- oder abgereichert werden.

23. Kit zur Anreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, umfassend ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,055 bis 1,065 g/ml aufweist, sowie gegebenenfalls ein Zentrifugationsgefäß.

24. Kit nach Anspruch 23, worin das Zellseparationsmedium eine Dichte im Bereich von 1,059 bis 1,061 g/ml und vorzugsweise von etwa 1,060 g/ml aufweist.

25. Kit zur Anreicherung von Blutstammzellen aus peripherem Blut oder Knochenmark, umfassend ein Zellseparationsmedium, das eine Dichte im Bereich von 1,061 bis 1,065 g/ml aufweist, sowie gegebenenfalls ein Zentrifugationsgefäß.

26. Kit nach Anspruch 25, worin das Zellseparationsmedium eine Dichte von etwa 1,062 g/ml aufweist.

27. Kit nach einem der Ansprüche 23-26, worin das Zentrifugationsgefäß eine poröse Barriere, einen Filter ein Sieb oder eine Klappe bevorzugt mit einer Dicke von 0,5-10 mm, vorzugsweise ca. 1-5 mm aufweist, die das Zentrifugationsgefäß in ein oberes und ein unteres Kompartiment unterteilen.

28. Kit nach Anspruch 27, worin die poröse Barriere, der Filter oder das Sieb eine Porengröße von 20-100 µm, vorzugsweise 20-30 µm aufweisen.

29. Kit nach Anspruch 27 oder 28, worin sich das Zellseparationsmedium im unteren Kompartiment des Zentrifugationsgefäßes befindet.

30. Zentrifugationsgefäß, dadurch gekennzeichnet, daß es durch eine Klappe in übereinanderliegende Kompartiments unterteilt ist.

31. Zentrifugationsgefäß nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Klappe im Ruhezustand des Zentrifugationsgefäßes verschlossen ist und während der Zentrifugation durch die Zentrifugationskraft geöffnet wird.

32. Zentrifugationsgefäß nach einem der Ansprüche 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Klappe eine Höhere Dichte als das zur Zentrifugation in das untere Kompartiment vorgelegte Medium aufweist.

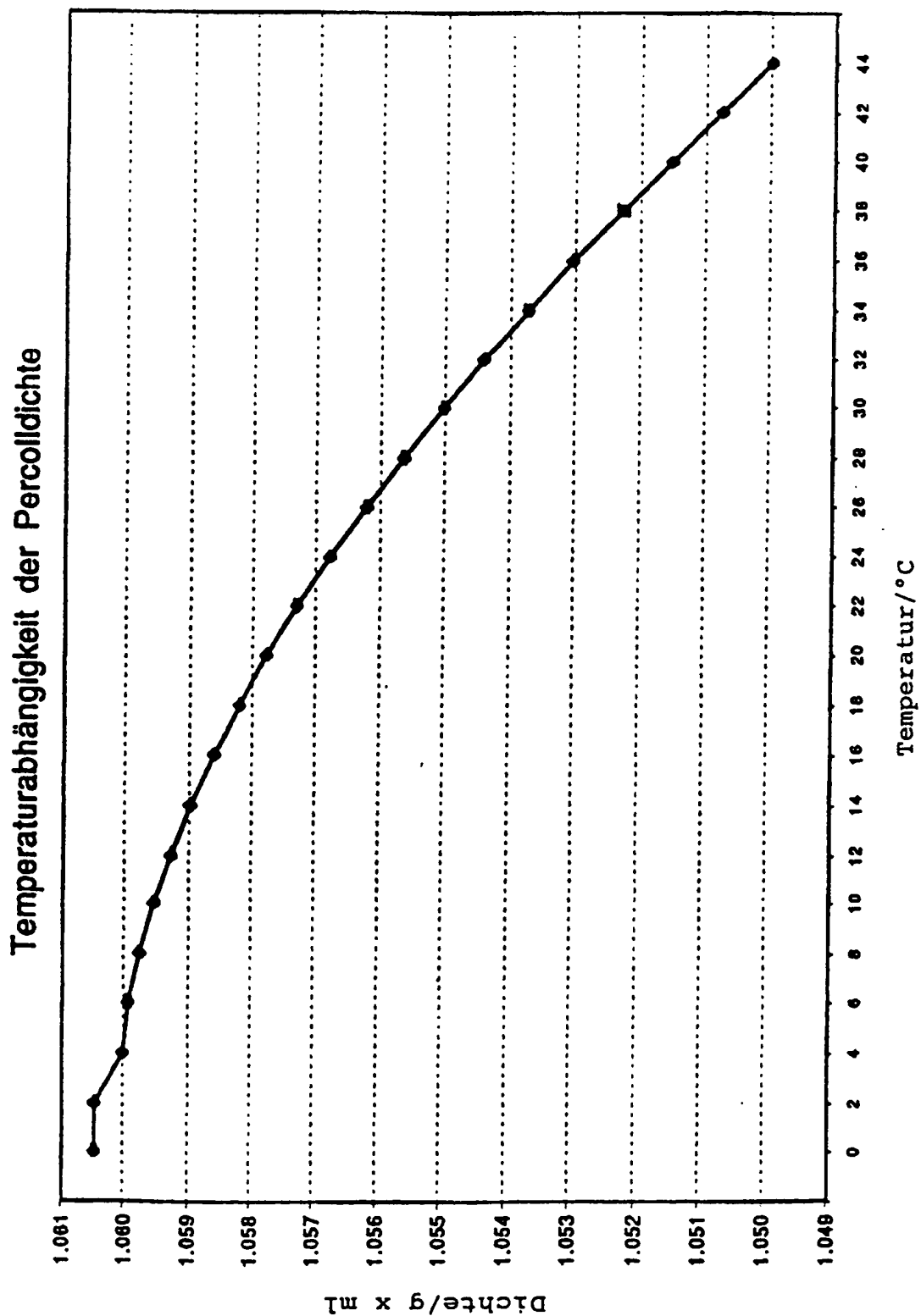
33. Zentrifugationsgefäß nach einem der Ansprüche 30-32, dadurch gekennzeichnet, daß die Klappe eine Dicke von 0,5-10 mm, vorzugsweise 1-5 mm aufweist.

34. Zentrifugationsgefäß nach einem der Ansprüche 30-33, dadurch gekennzeichnet, daß die Klappe a) starr mit dem Zentrifugationsgefäß verbunden ist, b) starr mit dem Zentrifugationsgefäß verbunden ist, wobei das Zentrifugationsgefäß selbst in zwei Teile, in einen unteren und in einen oberen Teil, zerlegbar ist und die Klappe des oberen Teils bildet, oder c) starr mit einem Einsatz verbunden ist, der in das Zentrifugationsgefäß eingeführt werden kann, wobei die Klappe den Boden des Einsatzes bildet.

35. Zentrifugationsgefäß nach einem der Ansprüche 30-34, dadurch gekennzeichnet, daß die Klappe sich von ihren äußeren Rändern aus in das untere Kompartiment öffnen kann.

1/12

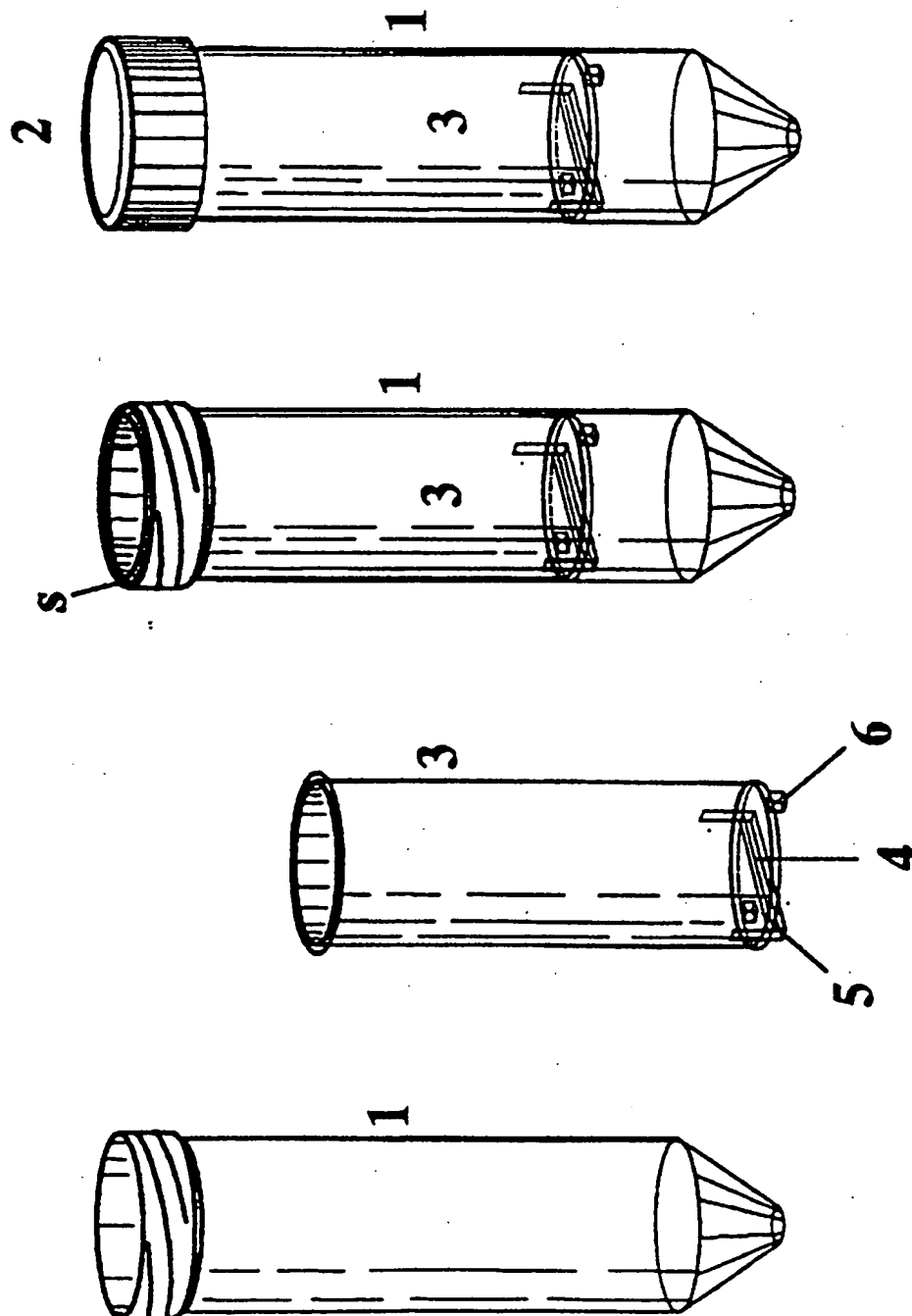
Figur 1



ERSATZBLATT (REGEL 26)

2/12

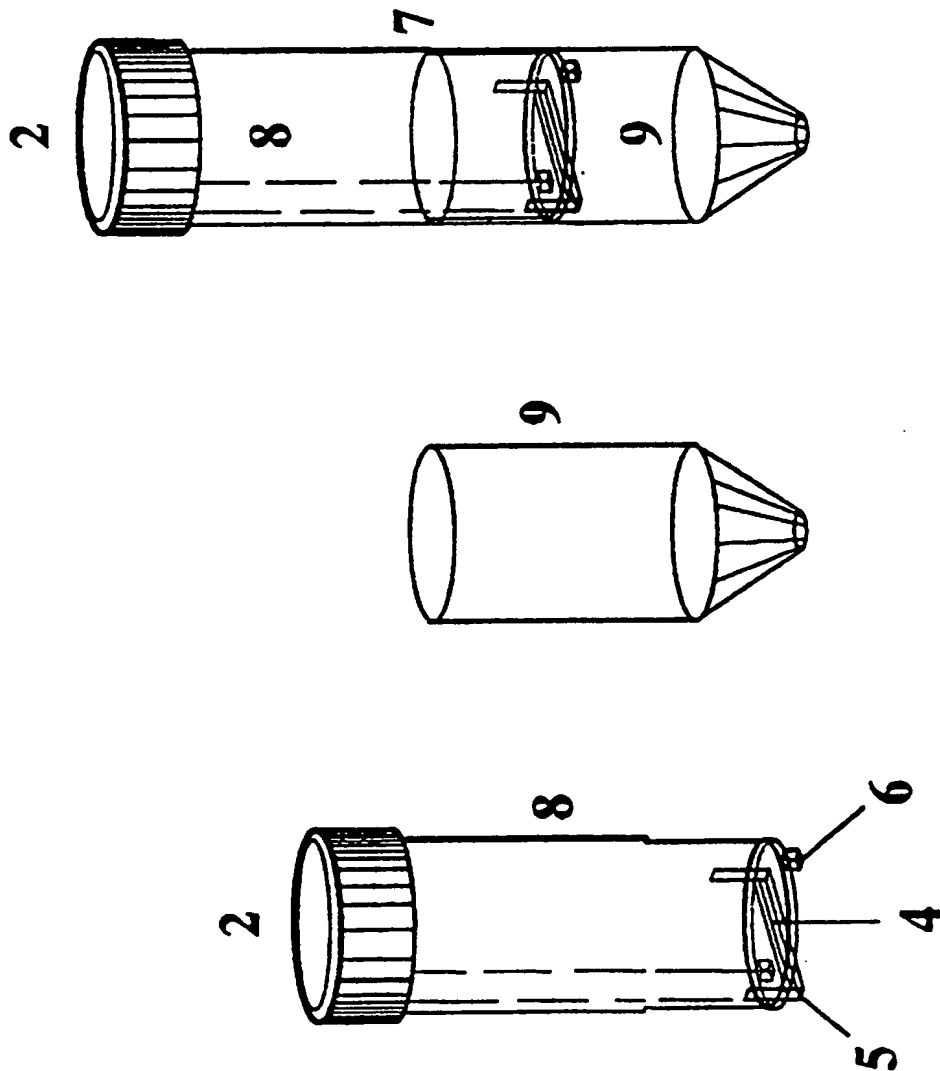
Figur 2



ERSATZBLATT (REGEL 26)

3/12

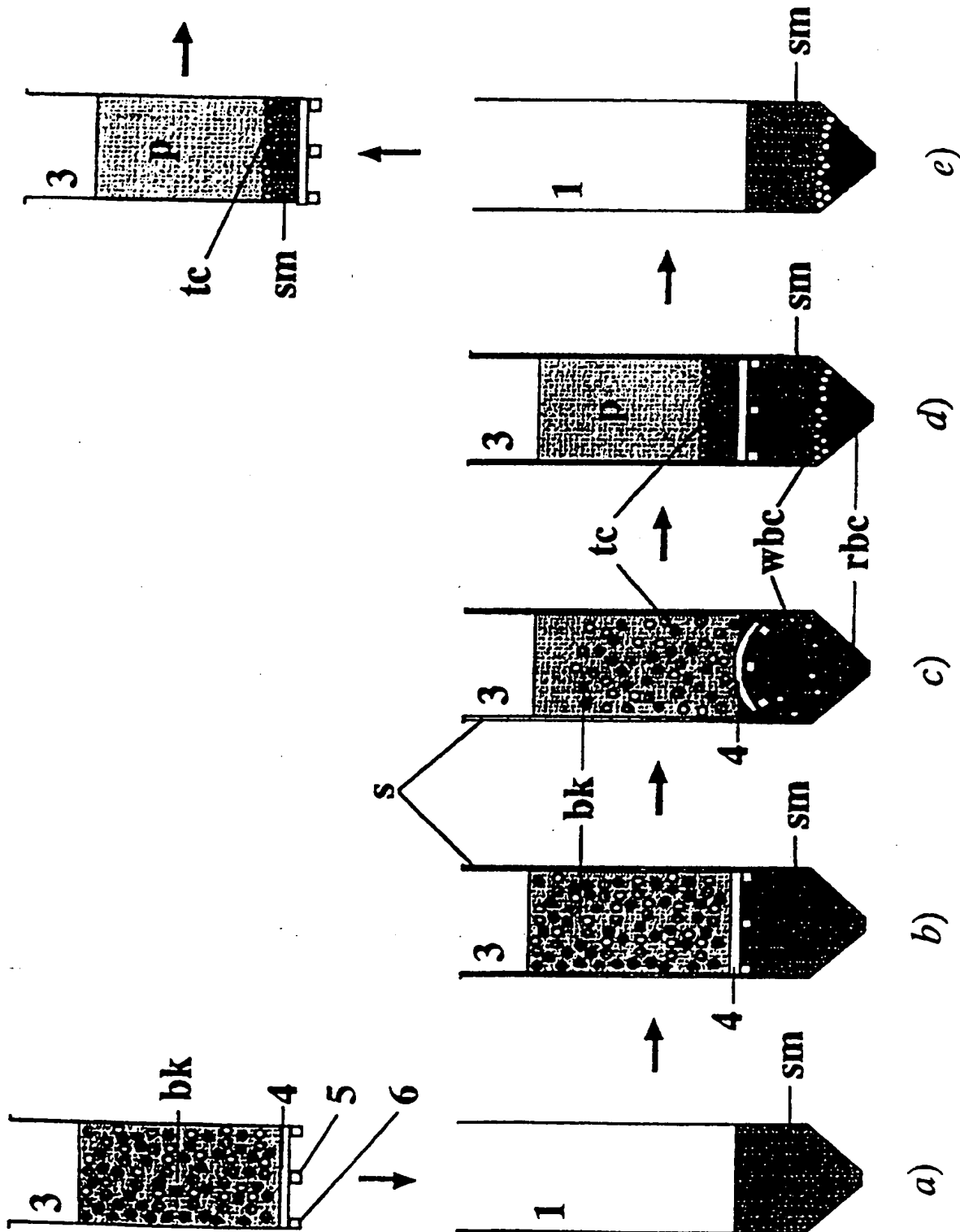
Figur 3



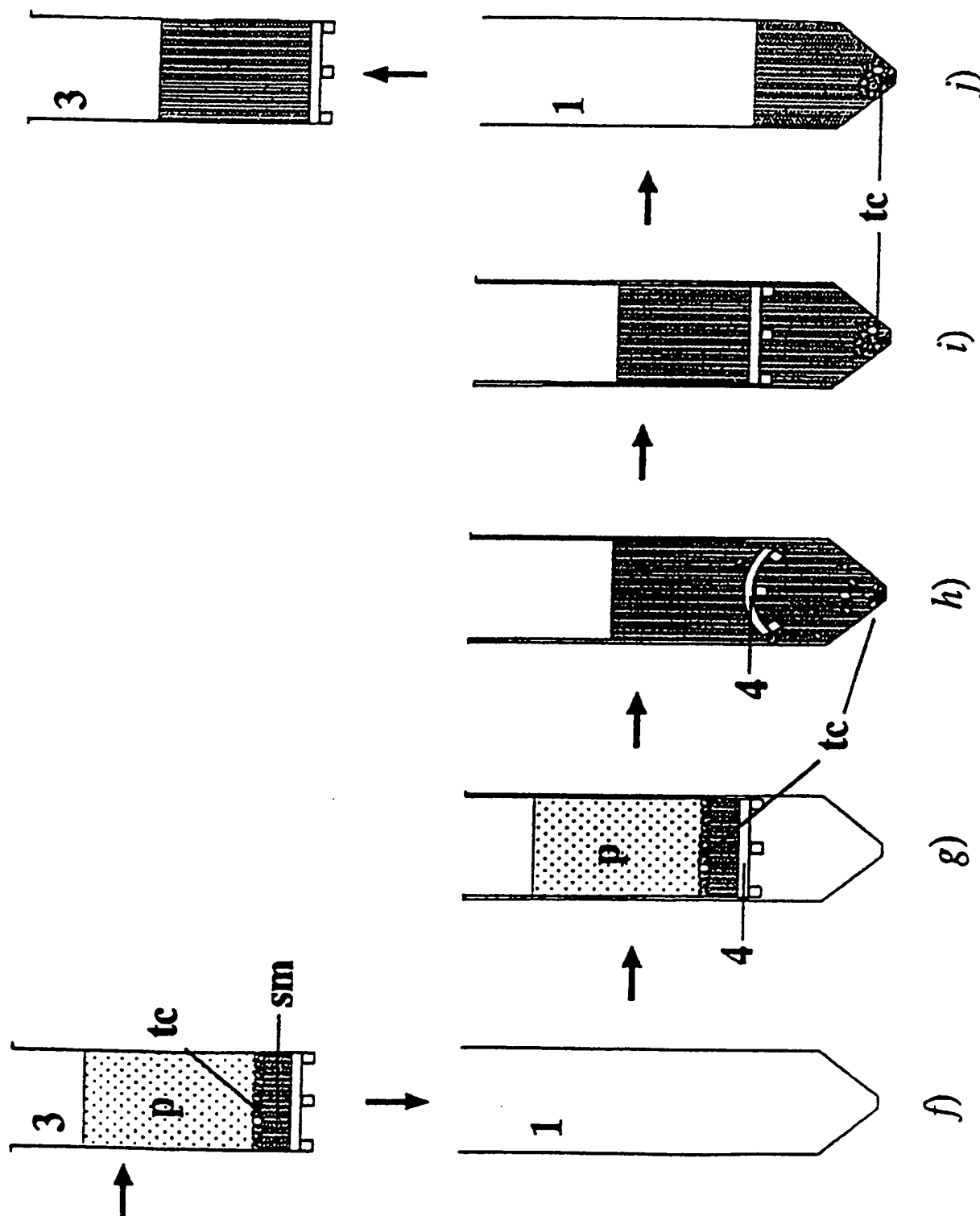
ERSATZBLATT (REGEL 26)

4/12

Figur 4



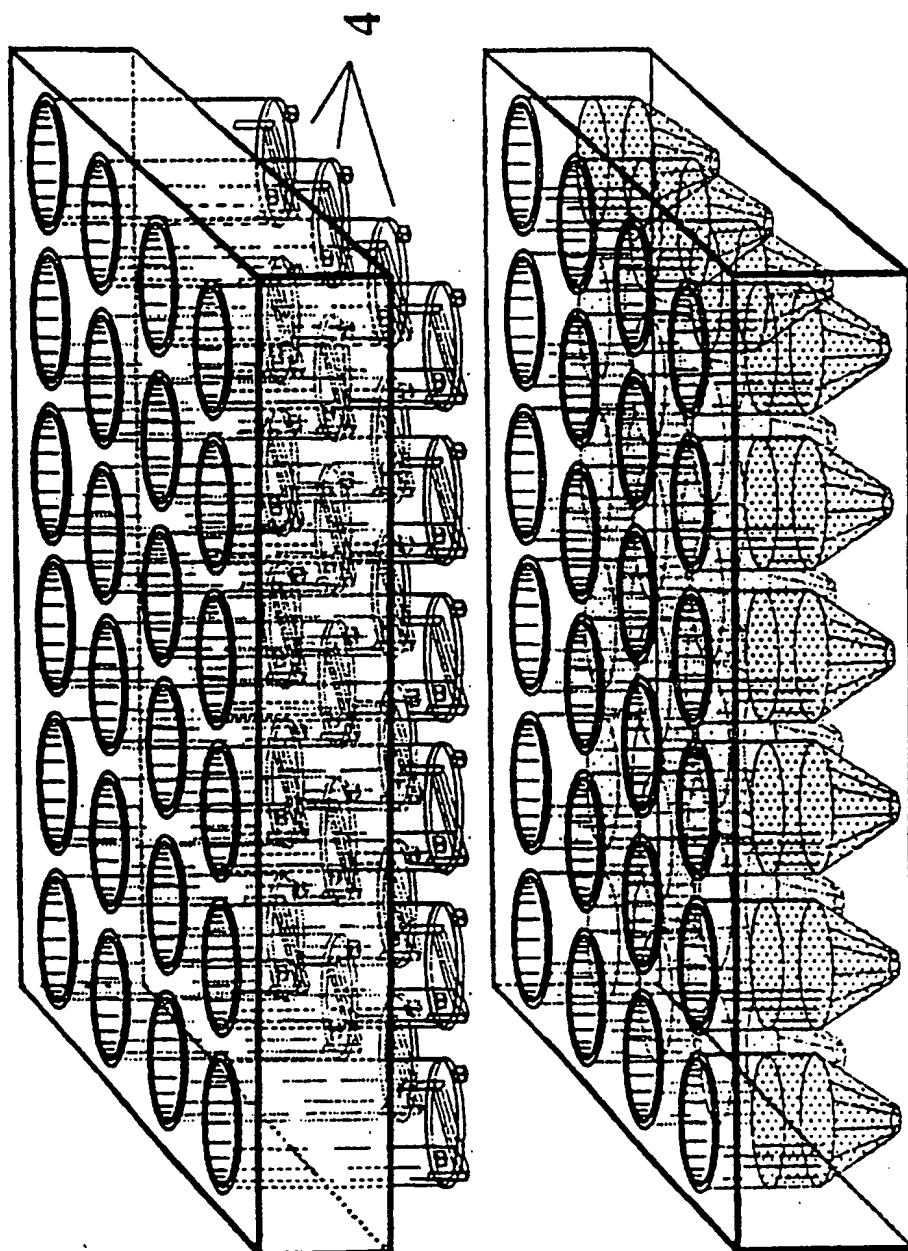
5/12

Figur 4
(Fortsetzung)

ERSATZBLATT (REGEL 26)

6/12

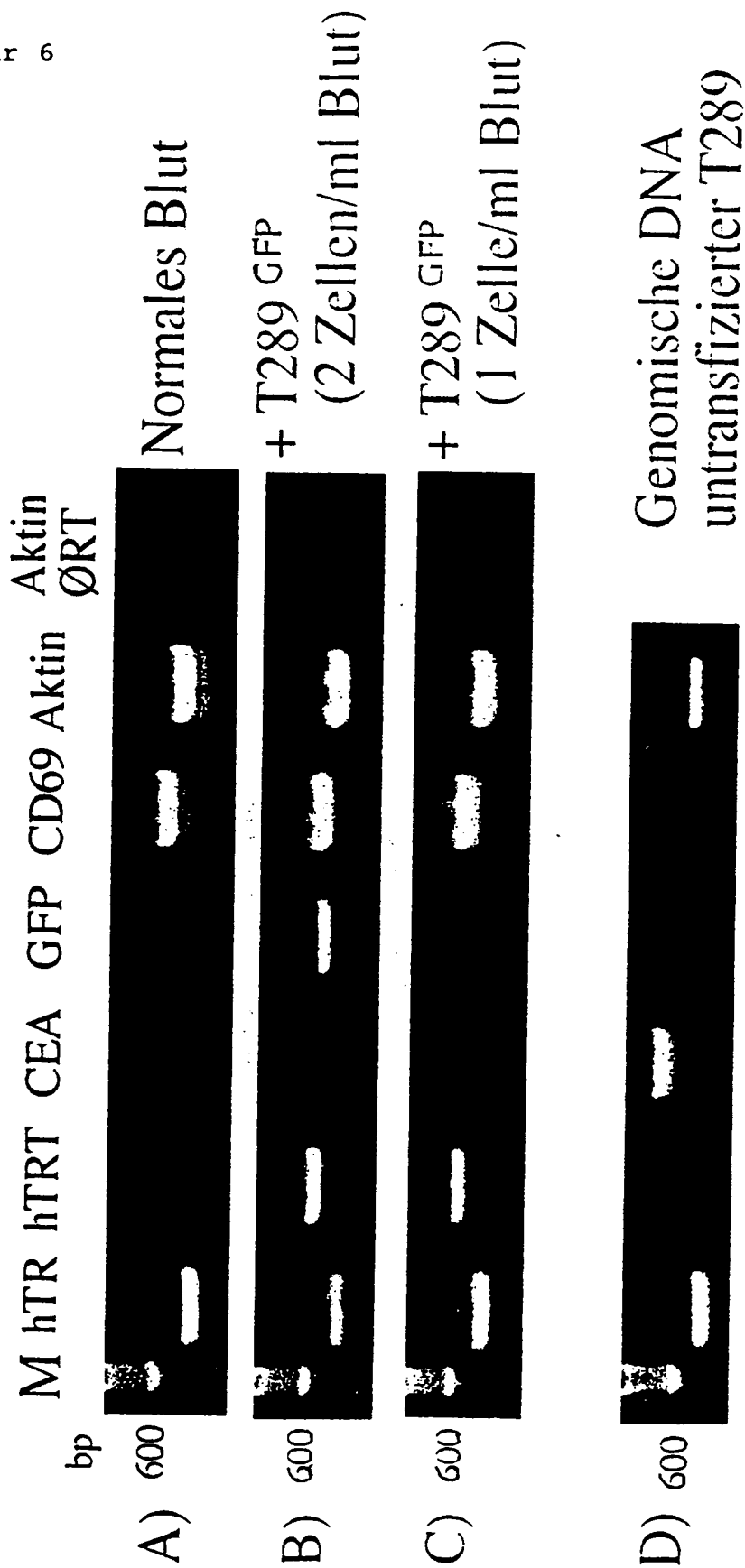
Figur 5



ERSATZBLATT (REGEL 26)

7/12

Figur 6



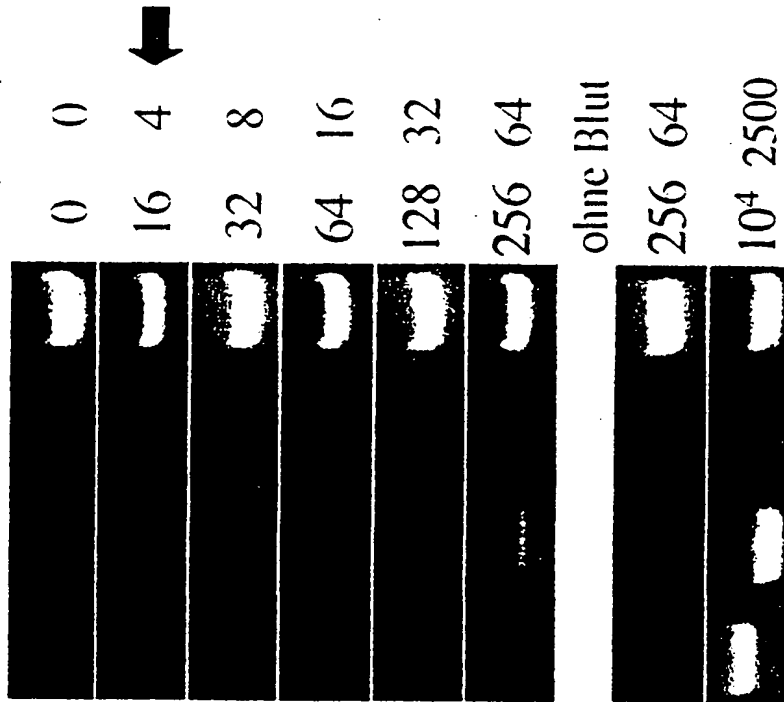
8/12

Figur 7

Tumorzellen
je 4 ml Blut
je PCR-Ansatz

B)

hTERT
hTR
CK20
Aktin

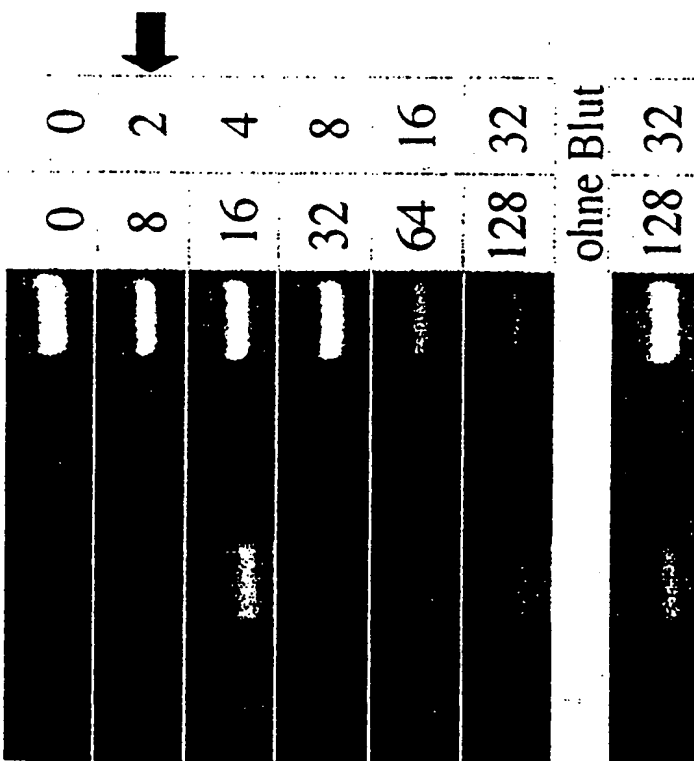


Mamma-Karzinom (MD MB-435s)

Tumorzellen
je 4 ml Blut
je PCR-Ansatz

A)

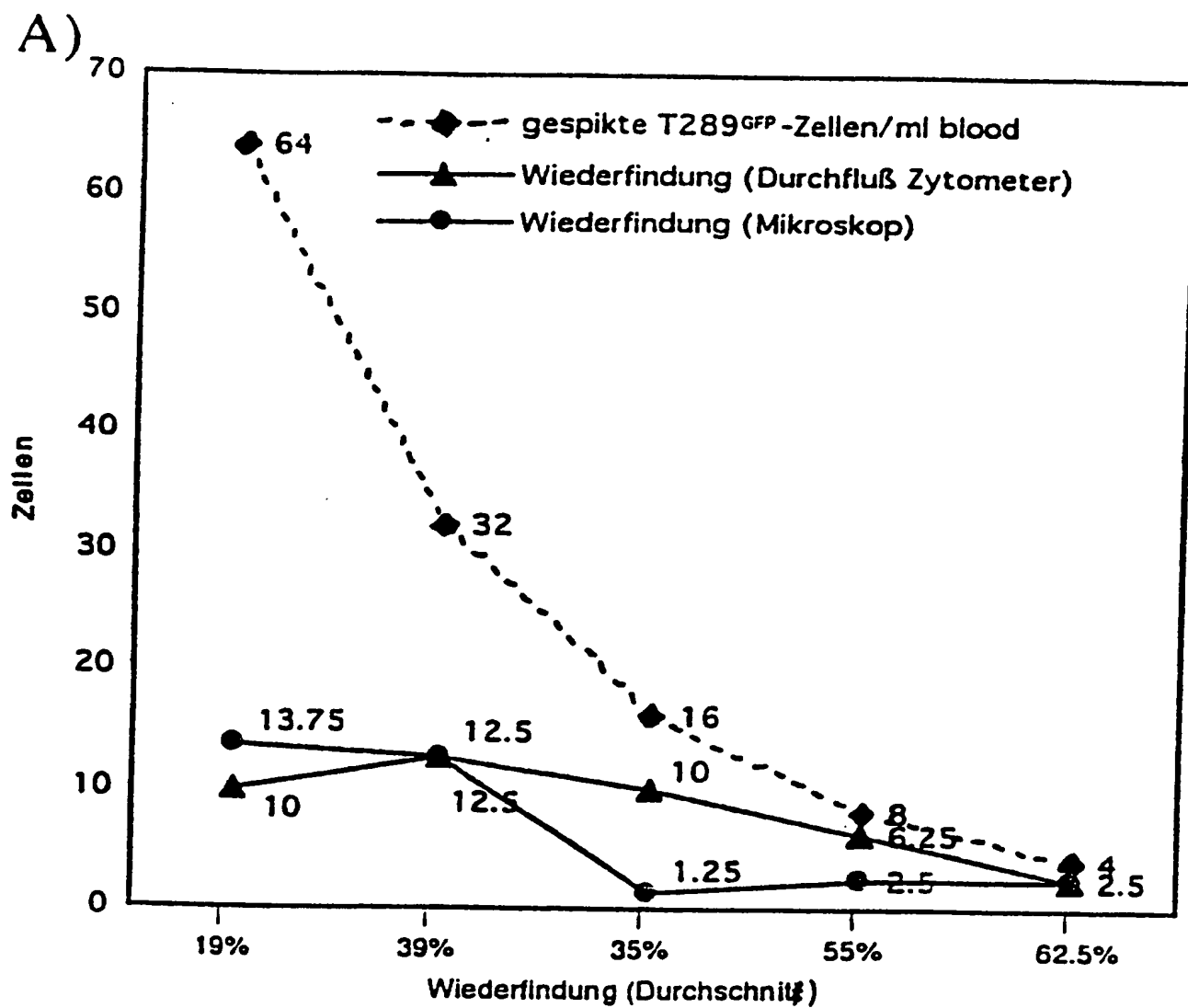
hTERT
hTR
CK20
Aktin



Prostata-Karzinom (PC-3)

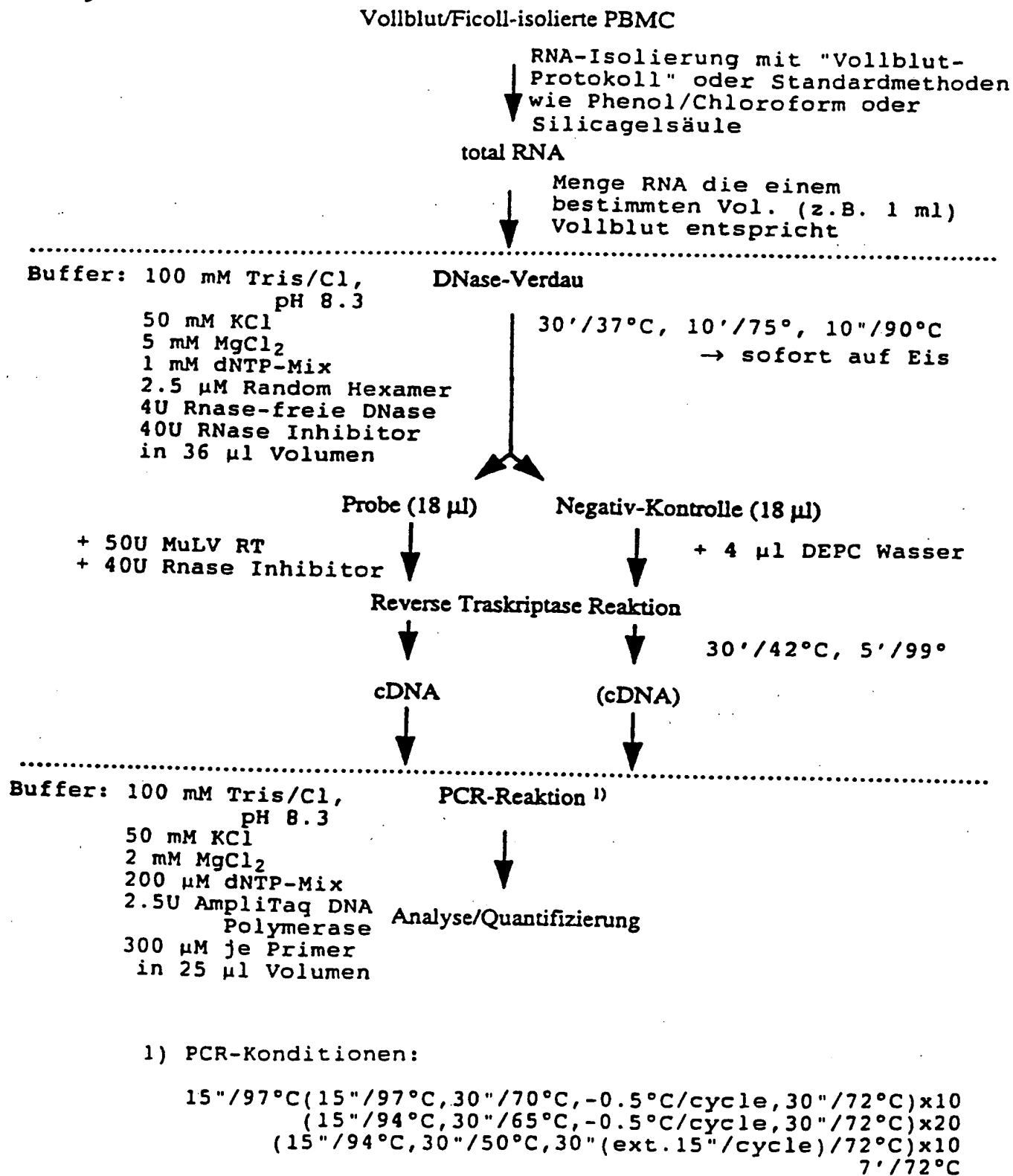
9/12

Figur 8



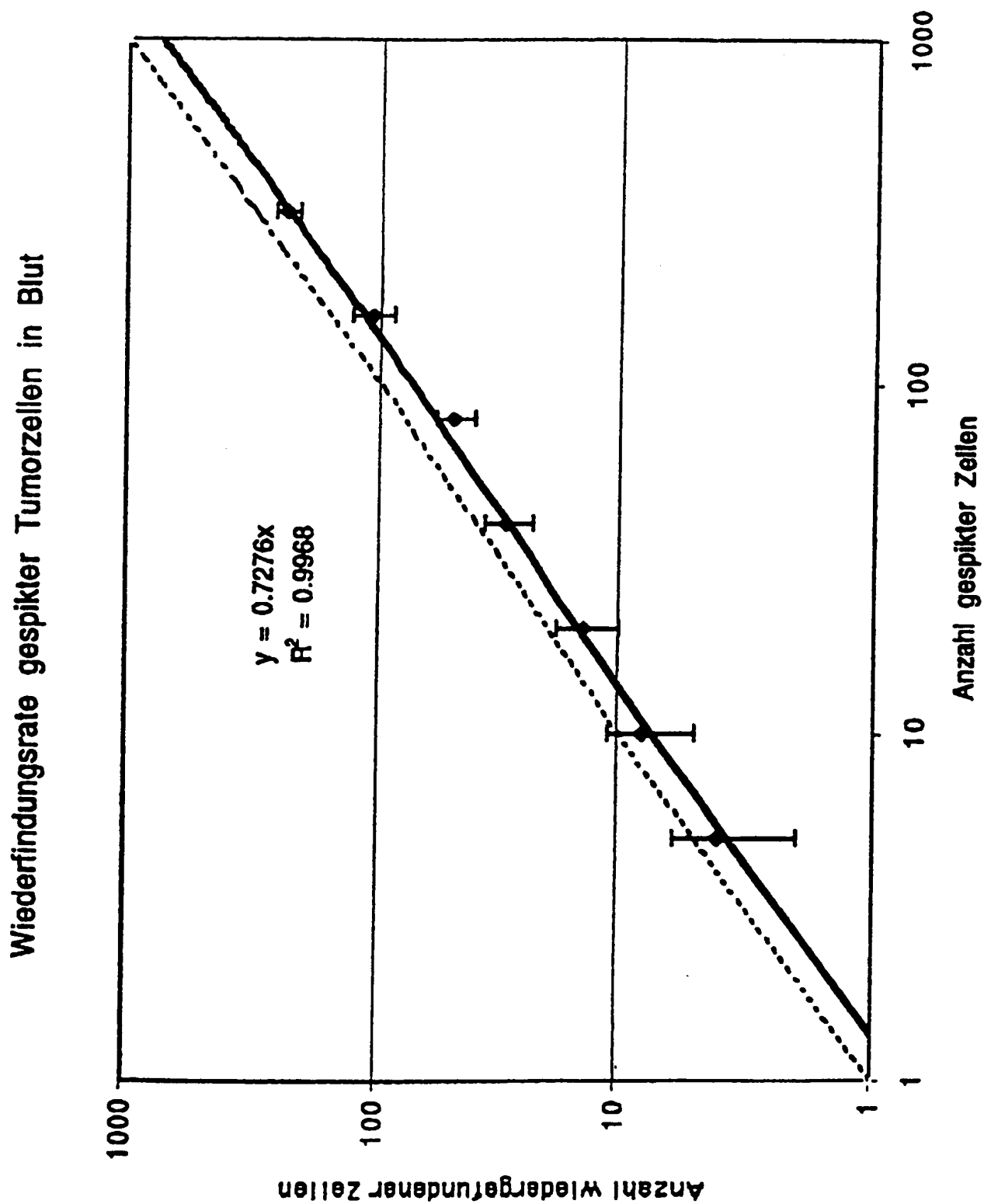
10/12

Figur 9



Figur 10

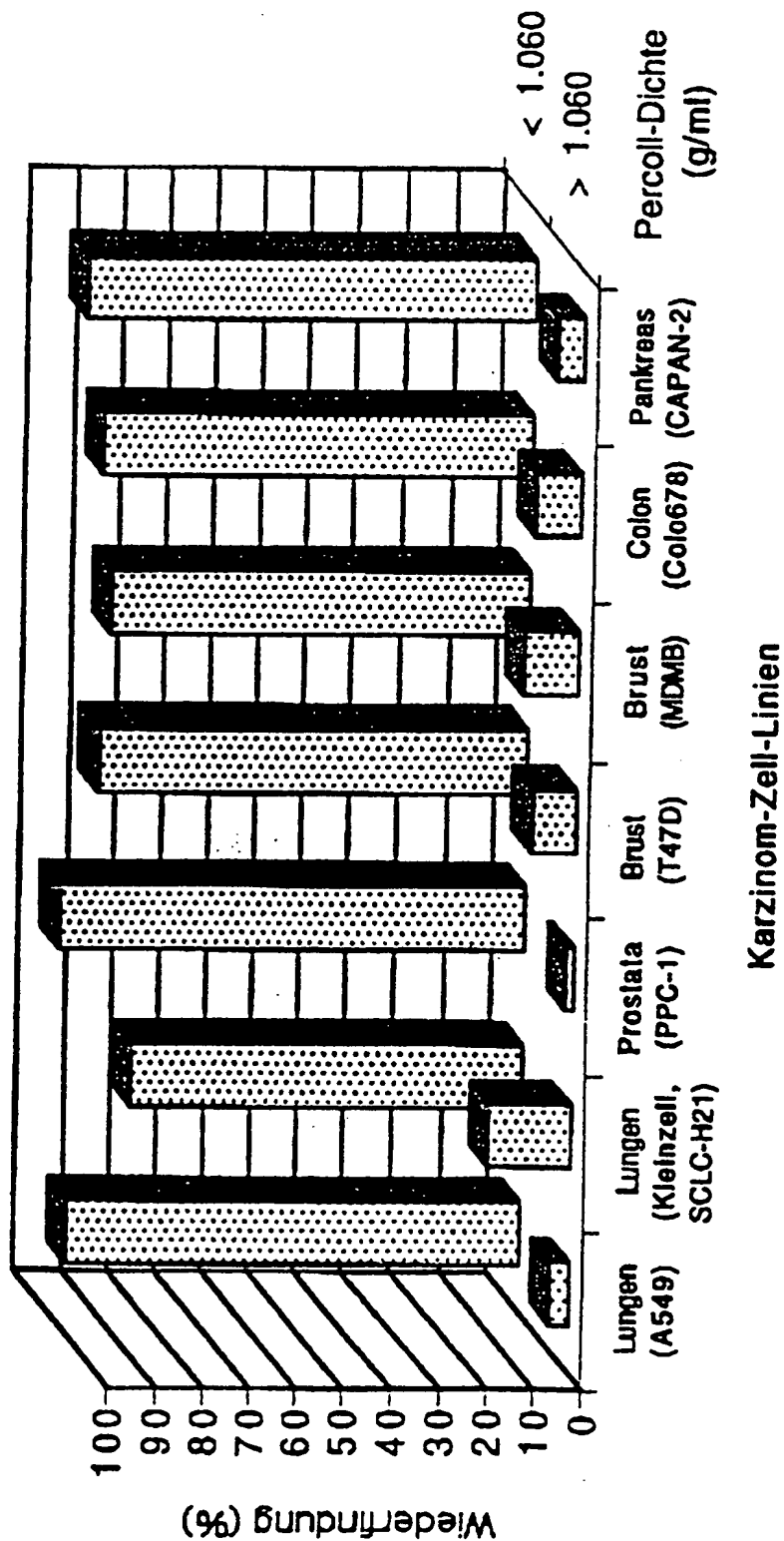
11/12



ERSATZBLATT (REGEL 26)

12/12

Figur 11



ERSATZBLATT (REGEL 26)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
10. August 2000 (10.08.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/46585 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 15/04,
15/05

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: DAHM, Michael, W. [DE/DE]; Gleimstrasse 2,
D-81677 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/00831

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Februar 2000 (02.02.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PHELPS, Robert,
C. [DE/DE]; Dohlenweg 6, D-85757 Karlsfeld (DE).
BROCKMEYER, Carsten [DE/DE]; Thanner Strasse
35a, D-83607 Holzkirchen (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: LEDERER, KELLER & RIEDERER; Prinzre-
gentenstrasse 16, D-80538 München (DE).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

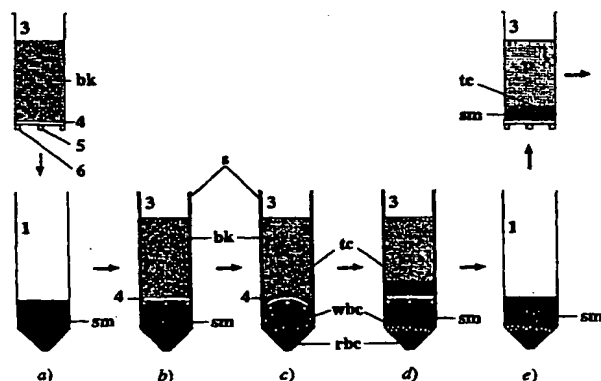
(30) Angaben zur Priorität:
199 04 267.5 3. Februar 1999 (03.02.1999) DE

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

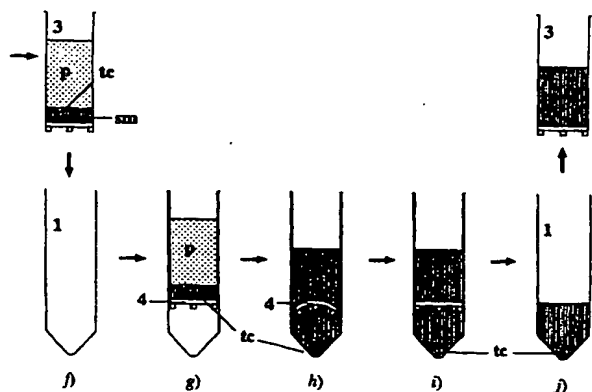
(54) Title: METHOD FOR ENRICHING OR DEPLETING TUMOUR CELLS OBTAINED FROM A BODY FLUID AND KIT
SUITABLE FOR THIS PURPOSE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR AN- ODER ABREICHERUNG VON TUMORZELLEN AUS EINER KÖRPERFLÜS-
SIGKEIT UND DAZU GEEIGNETER KIT



(57) Abstract: The invention relates to a method for enriching or depleting tumour cells obtained from a body fluid, according to which a cell separation medium having a specific density is covered with the body fluid and centrifuged. The invention also relates to a kit suitable for said method.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur An- oder Abreicherung von Tumorzellen aus einer Körperflüssigkeit, worin ein Zellseparationsmedium spezifischer Dichte mit der Körperflüssigkeit überschichtet und zentrifugiert wird. Ein für dieses Verfahren geeigneter Kit wird ebenfalls bereitgestellt.



WO 00/46585 A3



DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts:

26. April 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/00831

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N15/04 G01N15/05

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B01L B04B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 21488 A (ACTIVATED CELL THERAPY INC) 19 June 1997 (1997-06-19)	1,2,4-9, 17,18, 23-26 3
A	page 2, line 15-31 page 3, line 8-18 page 4, line 10-15	
X	US 5 663 051 A (VLASSELAER PETER VAN) 2 September 1997 (1997-09-02)	1,2, 23-26 3
A	column 2, line 25 -column 3, line 38	
X	US 5 840 502 A (VAN VLASSELAER PETER) 24 November 1998 (1998-11-24)	1,2, 23-26
	column 3, line 60 -column 5, line 11 column 24, line 40 -column 5, line 50	
	--- -/-- ---	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

8 document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2000

Date of mailing of the international search report

22.12.2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zinngrebe, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern: al Application No

PCT/EP 00/00831

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 270 171 A (CERCEK BORIS ET AL) 14 December 1993 (1993-12-14) column 28, line 42 -column 29, line 55 ---	1,2, 23-26
A	US 5 577 513 A (VAN VLASSELAER PETER) 26 November 1996 (1996-11-26) column 6, line 50 ---	1,2,26
A	WO 96 07097 A (ACTIVATED CELL THERAPY INC ;VLASSELAER PETER VAN (US)) 7 March 1996 (1996-03-07) page 2, line 3-11 page 3, line 14-24 page 31, line 26 -page 32, line 9 page 38, line 17 -page 39, line 15 page 40, line 18-25 ---	16,19-22
A	US 5 807 744 A (VAN BOCKSTAELE DIRK ET AL) 15 September 1998 (1998-09-15) column 9, line 44-61 ---	16,19-22
A	EP 0 875 202 A (BECTON DICKINSON CO) 4 November 1998 (1998-11-04) abstract; figure 4 ---	11-14, 27-29 30,31,33
A	US 3 945 928 A (AYRES WALDEMAR A) 23 March 1976 (1976-03-23) abstract; figure 2 ---	11-14, 27-29 30,31
A	US 3 887 464 A (AYRES WALDEMAR A) 3 June 1975 (1975-06-03) abstract; figure 2 ---	11-14, 27-29,34 30,31
A	US 3 741 400 A (DICK J) 26 June 1973 (1973-06-26) abstract; figures 3,4 ---	11-14, 27-29,34 30,31,35
A	EP 0 566 252 A (COBE LAB) 20 October 1993 (1993-10-20) abstract; figure 1 -----	10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 00/00831

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

All claims with the exception of 15
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Search Authority has found that this international application contains several (groups of) inventions as follows:

1. Claims: 1-9, 17, 18, 23-26

Centrifugation method at 1000 g

2. Claims: 10-14, 27-35

A shutter between the subdivisions and the cooling device to prevent mixing after separation

3. Claim: 15

Colorant to differentiate between separating agent and cells

4. Claims: 16, 19-22

Two-step method and separation of telomerase positive cells

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00831

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9721488 A	19-06-1997	US 5789148 A	04-08-1998
		US 5663051 A	02-09-1997
		AU 707878 B	22-07-1999
		AU 1415097 A	03-07-1997
		CA 2239729 A	19-06-1997
		EP 0958046 A	24-11-1999
US 5663051 A	02-09-1997	US 5474687 A	12-12-1995
		US 5646004 A	08-07-1997
		US 5840502 A	24-11-1998
		US 5648223 A	15-07-1997
		AU 707878 B	22-07-1999
		AU 1415097 A	03-07-1997
		CA 2239729 A	19-06-1997
		EP 0958046 A	24-11-1999
		WO 9721488 A	19-06-1997
		AT 186398 T	15-11-1999
		AU 700743 B	14-01-1999
		AU 3502595 A	22-03-1996
		CA 2198607 A	07-03-1996
		DE 69513188 D	09-12-1999
		DE 69513188 T	06-07-2000
		DK 778944 T	01-05-2000
		EP 0778944 A	18-06-1997
		ES 2140705 T	01-03-2000
		JP 10508190 T	18-08-1998
		NZ 292756 A	28-10-1998
		WO 9607097 A	07-03-1996
		US 5789148 A	04-08-1998
US 5840502 A	24-11-1998	US 5663051 A	02-09-1997
US 5270171 A	14-12-1993	AT 177116 T	15-03-1999
		AU 665337 B	04-01-1996
		AU 8287791 A	07-01-1992
		CA 2084767 A	19-12-1991
		DE 69130950 D	08-04-1999
		EP 0537276 A	21-04-1993
		FI 925736 A	17-12-1992
		IL 98455 A	10-01-1997
		JP 5509308 T	22-12-1993
		NO 924844 A	16-02-1993
		US 5580561 A	03-12-1996
		WO 9119736 A	26-12-1991
		US 5443967 A	22-08-1995
		US 5516643 A	14-05-1996
		AT 77390 T	15-07-1992
		AU 624071 B	04-06-1992
		AU 1595188 A	26-09-1988
		CA 1336404 A	25-07-1995
		DE 3872235 A	23-07-1992
		DE 3872235 D	23-07-1992
		DE 3872235 T	03-12-1992
		DK 616188 A	04-11-1988
		EP 0357637 A	14-03-1990
		FI 92832 B	30-09-1994
		NO 177596 B	10-07-1995
		WO 8806595 A	07-09-1988

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/00831

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5270171 A		EP 0407451 A JP 3503763 T WO 8908662 A	16-01-1991 22-08-1991 21-09-1989
US 5577513 A	26-11-1996	AT 168288 T AU 680383 B AU 3502395 A CA 2198606 A DE 69503512 D DE 69503512 T DK 778794 T EP 0778794 A ES 2121414 T JP 10509580 T NZ 292754 A WO 9606679 A	15-08-1998 24-07-1997 22-03-1996 07-03-1996 20-08-1998 08-04-1999 19-04-1999 18-06-1997 16-11-1998 22-09-1998 28-01-1999 07-03-1996
WO 9607097 A	07-03-1996	US 5648223 A US 5646004 A US 5474687 A AT 186398 T AU 700743 B AU 3502595 A CA 2198607 A DE 69513188 D DE 69513188 T DK 778944 T EP 0778944 A ES 2140705 T JP 10508190 T NZ 292756 A US 5663051 A US 5789148 A	15-07-1997 08-07-1997 12-12-1995 15-11-1999 14-01-1999 22-03-1996 07-03-1996 09-12-1999 06-07-2000 01-05-2000 18-06-1997 01-03-2000 18-08-1998 28-10-1998 02-09-1997 04-08-1998
US 5807744 A	15-09-1998	CA 2155920 A EP 0696639 A JP 2846605 B JP 8098679 A	14-02-1996 14-02-1996 13-01-1999 16-04-1996
EP 0875202 A	04-11-1998	US 5860937 A AU 6356098 A CA 2235260 A JP 10328167 A	19-01-1999 05-11-1998 30-10-1998 15-12-1998
US 3945928 A	23-03-1976	NONE	
US 3887464 A	03-06-1975	NONE	
US 3741400 A	26-06-1973	CA 936847 A	13-11-1973
EP 0566252 A	20-10-1993	CA 2093988 A DE 69323230 D JP 2500190 B JP 6121939 A US 5356365 A	16-10-1993 11-03-1999 29-05-1996 06-05-1994 18-10-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00831

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N15/04 G01N15/05

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N B01L B04B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 21488 A (ACTIVATED CELL THERAPY INC) 19. Juni 1997 (1997-06-19)	1,2,4-9, 17,18, 23-26 3
A	Seite 2, Zeile 15-31 Seite 3, Zeile 8-18 Seite 4, Zeile 10-15	
X	US 5 663 051 A (VLASSELAER PETER VAN) 2. September 1997 (1997-09-02)	1,2, 23-26 3
A	Spalte 2, Zeile 25 -Spalte 3, Zeile 38	
X	US 5 840 502 A (VAN VLASSELAER PETER) 24. November 1998 (1998-11-24)	1,2, 23-26
	Spalte 3, Zeile 60 -Spalte 5, Zeile 11 Spalte 24, Zeile 40 -Spalte 5, Zeile 50	

	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Dezember 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22.12.2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Zinngrebe, U

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern: ales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00831

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 270 171 A (CERCEK BORIS ET AL) 14. Dezember 1993 (1993-12-14) Spalte 28, Zeile 42 -Spalte 29, Zeile 55 ---	1,2, 23-26
A	US 5 577 513 A (VAN VLASSELAER PETER) 26. November 1996 (1996-11-26) Spalte 6, Zeile 50 ---	1,2,26
A	WO 96 07097 A (ACTIVATED CELL THERAPY INC ;VLASSELAER PETER VAN (US)) 7. März 1996 (1996-03-07) Seite 2, Zeile 3-11 Seite 3, Zeile 14-24 Seite 31, Zeile 26 -Seite 32, Zeile 9 Seite 38, Zeile 17 -Seite 39, Zeile 15 Seite 40, Zeile 18-25 ---	16,19-22
A	US 5 807 744 A (VAN BOCKSTAELE DIRK ET AL) 15. September 1998 (1998-09-15) Spalte 9, Zeile 44-61 ---	16,19-22
A	EP 0 875 202 A (BECTON DICKINSON CO) 4. November 1998 (1998-11-04) Zusammenfassung; Abbildung 4 ---	11-14, 27-29 30,31,33
X	US 3 945 928 A (AYRES WALDEMAR A) 23. März 1976 (1976-03-23) Zusammenfassung; Abbildung 2 ---	11-14, 27-29 30,31
A	US 3 887 464 A (AYRES WALDEMAR A) 3. Juni 1975 (1975-06-03) Zusammenfassung; Abbildung 2 ---	11-14, 27-29,34 30,31
X	US 3 741 400 A (DICK J) 26. Juni 1973 (1973-06-26) Zusammenfassung; Abbildungen 3,4 ---	11-14, 27-29,34 30,31,35
A	EP 0 566 252 A (COBE LAB) 20. Oktober 1993 (1993-10-20) Zusammenfassung; Abbildung 1 -----	10

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 00/00831

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☒ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

Alle Ansprüche; nur 15 nicht

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☒ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-9,17,18,23-26

Zentrifugationsverfahren bei 1000 g

2. Ansprüche: 10-14,27-35

Eine Klappe zwischen Unterteilungen und Kühlung zur Vermeidung von Mischung nach der Trennung

3. Anspruch : 15

Farbstoff zur Unterscheidung von Trennmedium und Zellen

4. Ansprüche: 16,19-22

Zweischrittverfahren und Trennung von Telomerase-positiven Zellen

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/00831

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9721488 A	19-06-1997	US 5789148 A	04-08-1998
		US 5663051 A	02-09-1997
		AU 707878 B	22-07-1999
		AU 1415097 A	03-07-1997
		CA 2239729 A	19-06-1997
		EP 0958046 A	24-11-1999
US 5663051 A	02-09-1997	US 5474687 A	12-12-1995
		US 5646004 A	08-07-1997
		US 5840502 A	24-11-1998
		US 5648223 A	15-07-1997
		AU 707878 B	22-07-1999
		AU 1415097 A	03-07-1997
		CA 2239729 A	19-06-1997
		EP 0958046 A	24-11-1999
		WO 9721488 A	19-06-1997
		AT 186398 T	15-11-1999
		AU 700743 B	14-01-1999
		AU 3502595 A	22-03-1996
		CA 2198607 A	07-03-1996
		DE 69513188 D	09-12-1999
		DE 69513188 T	06-07-2000
		DK 778944 T	01-05-2000
		EP 0778944 A	18-06-1997
		ES 2140705 T	01-03-2000
		JP 10508190 T	18-08-1998
		NZ 292756 A	28-10-1998
		WO 9607097 A	07-03-1996
		US 5789148 A	04-08-1998
US 5840502 A	24-11-1998	US 5663051 A	02-09-1997
US 5270171 A	14-12-1993	AT 177116 T	15-03-1999
		AU 665337 B	04-01-1996
		AU 8287791 A	07-01-1992
		CA 2084767 A	19-12-1991
		DE 69130950 D	08-04-1999
		EP 0537276 A	21-04-1993
		FI 925736 A	17-12-1992
		IL 98455 A	10-01-1997
		JP 5509308 T	22-12-1993
		NO 924844 A	16-02-1993
		US 5580561 A	03-12-1996
		WO 9119736 A	26-12-1991
		US 5443967 A	22-08-1995
		US 5516643 A	14-05-1996
		AT 77390 T	15-07-1992
		AU 624071 B	04-06-1992
		AU 1595188 A	26-09-1988
		CA 1336404 A	25-07-1995
		DE 3872235 A	23-07-1992
		DE 3872235 D	23-07-1992
		DE 3872235 T	03-12-1992
		DK 616188 A	04-11-1988
		EP 0357637 A	14-03-1990
		FI 92832 B	30-09-1994
		NO 177596 B	10-07-1995
		WO 8806595 A	07-09-1988

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern: des Aktenzeichens

PCT/EP 00/00831

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5270171 A		EP 0407451 A JP 3503763 T WO 8908662 A	16-01-1991 22-08-1991 21-09-1989
US 5577513 A	26-11-1996	AT 168288 T AU 680383 B AU 3502395 A CA 2198606 A DE 69503512 D DE 69503512 T DK 778794 T EP 0778794 A ES 2121414 T JP 10509580 T NZ 292754 A WO 9606679 A	15-08-1998 24-07-1997 22-03-1996 07-03-1996 20-08-1998 08-04-1999 19-04-1999 18-06-1997 16-11-1998 22-09-1998 28-01-1999 07-03-1996
WO 9607097 A	07-03-1996	US 5648223 A US 5646004 A US 5474687 A AT 186398 T AU 700743 B AU 3502595 A CA 2198607 A DE 69513188 D DE 69513188 T DK 778944 T EP 0778944 A ES 2140705 T JP 10508190 T NZ 292756 A US 5663051 A US 5789148 A	15-07-1997 08-07-1997 12-12-1995 15-11-1999 14-01-1999 22-03-1996 07-03-1996 09-12-1999 06-07-2000 01-05-2000 18-06-1997 01-03-2000 18-08-1998 28-10-1998 02-09-1997 04-08-1998
US 5807744 A	15-09-1998	CA 2155920 A EP 0696639 A JP 2846605 B JP 8098679 A	14-02-1996 14-02-1996 13-01-1999 16-04-1996
EP 0875202 A	04-11-1998	US 5860937 A AU 6356098 A CA 2235260 A JP 10328167 A	19-01-1999 05-11-1998 30-10-1998 15-12-1998
US 3945928 A	23-03-1976	KEINE	
US 3887464 A	03-06-1975	KEINE	
US 3741400 A	26-06-1973	CA 936847 A	13-11-1973
EP 0566252 A	20-10-1993	CA 2093988 A DE 69323230 D JP 2500190 B JP 6121939 A US 5356365 A	16-10-1993 11-03-1999 29-05-1996 06-05-1994 18-10-1994

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)